

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y DERMATOLOGÍA DE LA
FACULTAD DE MEDICINA DE MÁLAGA

Tesis Doctoral

Estudio de la Microbiota Intestinal en
pacientes con Síndrome Metabólico y
Enfermedad Hepática Grasa No Alcohólica.


Francisca Martín Ocaña

2 de Febrero de 2016



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Francisca Martín Ocaña

 <http://orcid.org/0000-0002-3134-205X>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es



©Francisca Martín Ocaña. 2016

fmartinocana@gmail.com



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

D. **Raúl J. Andrade Bellido**, Doctor en Medicina y Cirugía, Catedrático del Departamento de Medicina y Dermatología de la Universidad de Málaga y Jefe de Servicio del Área de Aparato Digestivo del Servicio de Aparato Digestivo del Hospital Universitario Virgen de la Victoria de Málaga

D. **José Manuel García Almeida**, profesor Asociado del Departamento de Medicina y Dermatología de la Facultad de Medicina de Málaga.

CERTIFICAN:

Que Dña. **Francisca Martín Ocaña** ha realizado personalmente y bajo nuestra dirección el trabajo de Tesis Doctoral "Estudio de la microbiota intestinal en pacientes con síndrome metabólico y enfermedad hepática grasa no alcohólica", que ha sido concluido con todo aprovechamiento, habiendo los que suscriben revisado esta Tesis y estando conformes con su presentación para ser juzgada.

Málaga, 16 de Noviembre de 2015

Dr. D. Raúl J. Andrade Bellido

Dr. D. José Manuel García Almeida



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AGRADECIMIENTOS:

Resulta difícil sintetizar en unas breves líneas mi enorme gratitud hacia todas aquellas personas que de una u otra manera, me han ayudado y han compartido conmigo la ilusión de este proyecto.

Al Doctor D. José Manuel García Almeida, por brindarme la oportunidad de realizar esta tesis doctoral, facilitándome todo lo que estaba a su alcance. Por su confianza, su buena disposición y por hacerme sonreír incluso en momentos de desesperación.

Al Doctor D. Raúl Andrade Bellido, por sus siempre acertados consejos y su amable supervisión.

Al Servicio de Aparato Digestivo del Hospital de la Axarquía de Vélez-Málaga, en especial a Inmaculada Morgado, por su generosidad y su tiempo.

Al personal de laboratorio y biblioteca del Hospital de la Axarquía, en especial a Teresa, Lucía y Toñi, por su inestimable ayuda en la recogida de muestras y datos.

Un agradecimiento muy especial a Sergio Urenda Esteba, mi marido, por su paciencia, comprensión incondicional y amor. Por acompañarme todo el tiempo necesario en éste y otros muchos momentos.

A mis padres, a los que admiro por ser un ejemplo de sacrificio y bondad.

A mis hermanas, a las que es imposible pagar su amor como se merecen.

A mi familia, por contribuir en la parte más humana: dándome siempre ánimos. En especial a Inmaculada Guerrero, por demostrarme siempre que se puede trabajar desde el corazón.

A mis amigos por comprender mis ausencias.

Y por último a los pacientes, verdaderos protagonistas de este trabajo.

Gracias a todos



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	17
1.1. <u>HÍGADO GRASO</u>	19
1.1.1. Definición y nomenclatura	
1.1.2. Epidemiología	
1.1.3. Etiopatogenia y fisiopatología	
1.1.3.1. Primer impacto: progresión de hígado normal a esteatosis	
1.1.3.2. Segundo impacto: progresión de esteatosis a esteatohepatitis.	
1.1.3.3. Tercer impacto: fibrogénesis	
1.1.4. Diagnóstico	
1.1.4.1. Clínica	
1.1.4.2. Laboratorio	
1.1.4.3. Métodos de imagen	
1.1.4.4. Biopsia hepática	
1.1.4.5. Marcadores serológicos indirectos	
1.1.4.6. OWLIver Test	
1.1.5. Historia natural y pronóstico	
1.1.6. Tratamiento	
1.2. <u>SÍNDROME METABÓLICO</u>	53
1.2.1. Definición y criterios diagnósticos	
1.2.2. Epidemiología	
1.2.3. Etiopatogenia y fisiopatología	
1.2.3.1. Obesidad	
1.2.3.2. Resistencia a la insulina y/o Diabetes Mellitus tipo 2	
1.2.3.3. Hipertensión arterial	
1.2.3.4. Dislipemia	
1.2.4. Diagnóstico	
1.2.4.1. Clínica	
1.2.4.2. Antropometría	
1.2.4.3. Laboratorio	
1.2.5. Tratamiento	
1.3. <u>MICROBIOTA INTESTINAL</u>	77
1.3.1. Definición de microbiota del tracto gastrointestinal	
1.3.2. Influencia de factores genéticos y ambientales en la microbiota intestinal	
1.3.3. El desarrollo de la microbiota intestinal	
1.3.4. Características y composición de la microbiota intestinal	
1.3.5. Funciones de la microbiota intestinal	
1.3.5.1. Capacidad metabólica de la microbiota intestinal	
1.3.5.2. Protección contra los microorganismos externos	
1.3.5.3. Maduración y función del sistema inmune de la mucosa	

1.3.6.	Implicaciones de la microbiota intestinal en la salud	
1.3.6.1.	Infecciones gastrointestinales	
1.3.6.2.	Enfermedades de base inmunológica	
1.3.6.3.	Cáncer de colon	
1.3.6.4.	Enfermedades metabólicas	
1.3.6.4.1.	Microbiota y obesidad	
1.3.6.4.2.	Microbiota y DM 2	
1.3.6.4.3.	Microbiota y enfermedad hepática	
1.3.7.	Métodos de estudio de la microbiota intestinal	
1.3.7.1.	Métodos tradicionales directos	
1.3.7.2.	Métodos tradicionales indirectos	
1.3.7.3.	Métodos moleculares	
1.3.7.3.1.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	
1.3.7.4.	Metagenómica.	
1.3.8.	Tratamiento	
2.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	105
2.1.	<u>HIPÓTESIS</u>	
2.2.	<u>OBJETIVOS</u>	
3.	MATERIAL Y MÉTODOS	109
3.1.	<u>DISEÑO Y SUJETOS DEL ESTUDIO</u>	111
3.1.1.	Diseño del estudio	
3.1.2.	Sujetos del estudio	
3.2.	<u>VARIABLES DEL ESTUDIO</u>	112
3.2.1.	Variables antropométricas	
3.2.2.	Variables en relación con NAFLD	
3.2.2.1.	Parámetros analíticos	
3.2.2.2.	Parámetros ecográficos	
3.2.3.	Variables en relación con SM	
3.2.3.1.	Parámetros analíticos	
3.2.3.2.	Parámetros diagnósticos	
3.2.4.	Variables en relación con adherencia a la dieta mediterránea	
3.2.5.	Variables en relación con ejercicio físico	
3.2.6.	Variables en relación con microbiota intestinal	
3.3.	<u>INSTRUMENTACIÓN</u>	114
3.3.1.	Obtención de medidas antropométricas	
3.3.2.	Obtención de imágenes ecográficas	
3.3.3.	Obtención de muestras biológicas	
3.3.3.1.	Muestras de sangre en ayunas	
3.3.3.2.	Muestras de heces	
3.3.4.	Determinación de variables bioquímicas	
3.3.5.	Determinación de variables metabólicas	
3.3.6.	Determinación de variables del microbioma	
3.4.	<u>ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS</u>	117
3.5.	<u>ASPECTOS ÉTICOS DEL ESTUDIO</u>	118
4.	RESULTADOS	119
4.1.	<u>VARIABLES ANTROPOMÉTRICAS Y BIOQUÍMICAS</u>	121

4.1.1.	Edad	
4.1.2.	Peso, índice de masa corporal, cintura	
4.1.3.	Metabolismo basal, impedancia, masa grasa, masa magra, agua total	
4.1.4.	Glucosa basal	
4.1.5.	Hemoglobina Glicosilada (HbA1c)	
4.1.6.	Insulina basal	
4.1.7.	Péptido C	
4.1.8.	Colesterol	
4.1.9.	Triglicéridos	
4.1.10.	Ácido úrico	
4.1.11.	Proteína C Reactiva	
4.1.12.	Aspartato aminotransferasa (AST), Alanina aminotransferasa (ALT), Gamma-glutamil transpeptidasa (GGT)	
4.2.	<u>VARIABLES EN RELACIÓN CON NAFLD</u>	131
4.2.1.	Patrón de transaminasas	
4.2.2.	Ecografía de abdomen	
4.2.3.	OWLiver Test	
4.3.	<u>VARIABLES EN RELACIÓN CON EL SÍNDROME METABÓLICO</u>	133
4.3.1.	Perímetro de la cintura	
4.3.2.	Hiperglucemia y/o Diabetes Mellitus tipo 2	
4.3.3.	Hipertensión arterial	
4.3.4.	HDL-Colesterol	
4.3.5.	Triglicéridos	
4.3.6.	Número de factores de riesgo de SM	
4.4.	<u>VARIABLES EN RELACIÓN CON LA ADHERENCIA A LA DIETA MEDITERRÁNEA</u>	139
4.4.1.	Aceite de oliva	
4.4.2.	Verduras u hortalizas	
4.4.3.	Fruta	
4.4.4.	Carnes rojas, hamburguesas, salchichas o embutidos	
4.4.5.	Mantequilla, margarina o nata	
4.4.6.	Bebidas carbonatadas y/o azucaradas	
4.4.7.	Vino	
4.4.8.	Legumbres	
4.4.9.	Pescados y mariscos	
4.4.10.	Repostería industrial	
4.4.11.	Frutos secos	
4.4.12.	Carnes magras y grasas	
4.4.13.	Platos caseros (sofrito)	
4.4.14.	Puntuación total del cuestionario de adherencia a DME	
4.5.	<u>VARIABLES EN RELACIÓN CON EL EJERCICIO FÍSICO</u>	147
4.5.1.	Actividad física	
4.5.2.	IPAQ intenso	
4.5.3.	IPAQ moderado	
4.5.4.	IPAQ ligero	
4.5.5.	IPAQ total	
4.5.6.	Sedentarismo	

4.6.	<u>VARIABLES EN RELACIÓN CON LA MICROBIOTA INTESTINAL</u>	150
4.6.1.	RQ Bacteroidetes	
4.6.2.	RQ Firmicutes	
4.6.3.	RQ Actinobacterias	
4.6.4.	RQ Fusobacterias	
4.6.5.	Ratio Firmicutes/Bacteroidetes	
4.6.6.	Δ Ct Bacteroidetes	
4.6.7.	Δ Ct Firmicutes	
4.6.8.	Δ Ct Actinobacterias	
4.6.9.	Δ Ct Fusobacterias	
4.7.	<u>ASOCIACIONES DE LAS VARIABLES ANTROPOMÉTRICAS Y BIOQUÍMICAS DEL ESTUDIO</u>	154
4.7.1.	Asociaciones de las variables antropométricas entre sí	
4.7.1.1.	Edad	
4.7.1.2.	Índice de masa corporal	
4.7.1.3.	Perímetro de la cintura	
4.7.1.4.	Metabolismo basal	
4.7.1.5.	Impedancia	
4.7.1.6.	Masa grasa	
4.7.1.7.	Masa magra	
4.7.2.	Asociaciones de las variables bioquímicas entre sí	
4.7.2.1.	Glucosa	
4.7.2.2.	HbA1c	
4.7.2.3.	Insulina	
4.7.2.4.	Péptido C	
4.7.2.5.	Colesterol total	
4.7.2.6.	HDL-Colesterol	
4.7.2.7.	Triglicéridos	
4.7.2.8.	GOT	
4.7.2.9.	GPT	
4.7.2.10.	GGT	
4.7.3.	Asociaciones entre variables antropométricas y bioquímicas	
4.8.	<u>ASOCIACIONES DE LAS VARIABLES RELACIONADAS CON NAFLD DEL ESTUDIO</u>	160
4.8.1.	Patrón de transaminasas	
4.8.2.	Ecografía de abdomen	
4.8.3.	OWLiver Test	
4.9.	<u>ASOCIACIONES DE LAS VARIABLES RELACIONADAS CON SM DEL ESTUDIO</u>	162
4.9.1.	Hiperglucemia	
4.9.2.	Número de factores de riesgo de SM	
4.10.	<u>ASOCIACIONES DE LAS VARIABLES RELACIONADAS CON LA ADHERENCIA A LA DIETA MEDITERRÁNEA DEL ESTUDIO</u>	163
4.11.	<u>ASOCIACIONES DE LAS VARIABLES RELACIONADAS CON LA MICROBIOTA INTESTINAL</u>	163
4.11.1.	Asociaciones entre variables antropométricas y la microbiota intestinal.	

- 4.11.2. Asociaciones entre variables bioquímicas y de la microbiota intestinal
- 4.11.3. Asociaciones entre variables de NAFLD y de la microbiota intestinal
 - 4.11.3.1. Ecografía abdominal
 - 4.11.3.2. OWLIver Test
- 4.11.4. Asociaciones entre variables de adherencia a la dieta mediterránea y de la microbiota intestinal
 - 4.11.4.1. Aceite de oliva
 - 4.11.4.2. Vino
- 4.11.5. Asociaciones entre variables relacionadas con el ejercicio físico y la microbiota intestinal
- 4.11.6. Asociaciones entre variables de la microbiota entre sí

5. DISCUSIÓN	169
6. CONCLUSIONES	183
7. BIBLIOGRAFÍA	189
8. ANEXO	219



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ABREVIACIONES

ACT:	Agua corporal total
AEC:	Agua extracelular
AG:	Ácidos grasos
AGNE:	Ácidos grasos no esterificados
AGCC:	Ácidos grasos de cadena corta
AIC:	Agua intracelular
ALT:	Alanina aminotransferasa
AMP:	Adenosinmonofosfato
AMPK:	Proteína cinasa activada por Adenosinmonofosfato
Apo-E:	Apoproteína E
AST:	Aspartato aminotransferasa
BH:	Biopsia hepática
BIA:	Impedancia bioeléctrica
CEH:	Células estrelladas hepáticas
ChREBP:	Proteína de unión al elemento de respuesta a hidratos de carbono
CK:	Citoqueratina
CRH:	Corticotropina
CYP:	Citocromo
DAMPs:	Patrones moleculares asociados a daño.
DASH:	Dietary Approaches to Stop Hypertension
DM:	Diabetes Mellitus
DME:	Dieta Mediterránea
ECV:	Enfermedad Cardiovascular
EHGNA:	Enfermedad Hepática Grasa no Alcohólica
EHNA:	Esteatohepatitis No Alcohólica
EII:	Enfermedad Inflamatoria Intestinal
ELFG:	European Liver Fibrosis Group
ERO:	Especies reactivas de oxígeno
ES:	Esteatosis hepática simple
EE.UU.:	Estados Unidos
EOSS:	Edmont Obesity Staging System
FA:	Fosfatasa Alcalina
FIAF:	Factor adiposo inducido por ayuno
FLI:	Fatty Liver Index
GEB:	Gasto energético basal

GF: Libre de gérmenes

GGT: Gamma-glutamyl-transpeptidasa

GNMT-KO: Glicina N-metiltransferasa Knockout

HbA1c: Hemoglobina Glicosilada

HNE: Aldehído 4-hidroxinonenal

HTA: Hipertensión arterial

IASO: Asociación Internacional para el Estudio de la Obesidad

IDF: International Diabetes Federation

IG: Intolerancia glucídica

IGF: Factor de crecimiento de tipo insulínico

IL: Interleucina

IMC: Índice de masa corporal

IPAQ: International Physical Activity Questionnaire

IRS: Insulin Receptor Substrate

LAP: Lipid Accumulation Product

LOX: Lipooxigenasa hepática

LPL: Lipoproteína lipasa

LPS: Lipopolisacáridos

LXR: Receptor X del hígado

MAT: Metionina Adenosiltransferasa

MCC: Masa celular corporal

MDA: Malondialdehído

MG: Masa grasa

MLG: Masa libre de grasa

MSH: Hormona estimuladora de melanocitos

MTTP: Proteína microsomal de transferencia de triglicéridos

NAFLD: Non-Alcoholic Fatty Liver Disease

NASH: Non Alcoholic Steatohepatitis

NCEP-ATP III: National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III

NHANES: US National Health and Nutrition Examination Survey

NPY: Neuropeptido Y

OMS: Organización Mundial de la Salud

ON: Óxido Nítrico

PAMP's: Patrones moleculares asociados a patógenos

PUFA: Ácidos Grasos Poliinsaturados

RE: Retículo endoplásmico

RI: Resistencia a la Insulina
RL: Radical libre
RLO: Radical libre de oxígeno
RMN: Resonancia Magnética Nuclear
SAH: S-Adenosil
SAMe: S-Adenosilmetionina
SEEDO: Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad
SM: Síndrome Metabólico
SRAA: Sistema renina-angiotensinaaldosterona
SREBP: Sterol regulatory element binding protein
TAC: Tomografía Axial Computerizada
TG: Triglicéridos.
TGF- β : Factor transformador del crecimiento beta
TGI: Tracto gastrointestinal
TLR: Toll-like-receptors
TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa
UFC: Unidad formadora de colonias
UPLC-MS: Cromatografía líquida de alta resolución acoplada espectrometría de masas
US: Ecografía abdominal
VLDL: Very Low Density Lipoproteins



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ERRATA

Título: Estudio de la Microbiota Intestinal en pacientes con Síndrome Metabólico y Enfermedad Hepática Grasa No Alcohólica.

Dña. Francisca Martín Ocaña.

Málaga.

Universidad de Málaga.

Página	Línea	Dice	Debe decir
--------	-------	------	------------



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. Introducción

1. Introducción

1.1. HÍGADO GRASO

1.1.1. DEFINICIÓN Y NOMENCLATURA

La enfermedad grasa del hígado es una enfermedad hepática crónica que se caracteriza por el depósito de grasa intrahepatocitaria, pudiendo estar asociada o no a diferentes grados de daño hepatocelular, cambios inflamatorios y fibrosis. Simulan la afectación hepática inducida por el alcohol, pero sin que medie éste último en su aparición. Se han utilizado muchos términos para referirse a esta entidad, aunque la definición aceptada internacionalmente es *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)* o *Enfermedad hepática grasa no alcohólica (EHGNA)*. (1) Nos referiremos en adelante a ella con su acrónimo en inglés.

Esta entidad fue descrita por primera vez por Ludwig en 1980. (2) NAFLD engloba un espectro de lesiones que comprende desde la forma más benigna o *esteatosis hepática simple (ES)* a las formas más severas, que en orden progresivo de evolución son la esteatosis asociada a cambios necroinflamatorios con grados variables de fibrosis denominada *esteatohepatitis no alcohólica (EHNA)* o *Non Alcoholic Steatohepatitis (NASH)*, la cirrosis hepática e, incluso, el hepatocarcinoma.

Actualmente se considera que la NAFLD es el componente hepático del denominado síndrome metabólico (SM), que se puede definir como la agrupación de diferentes factores de riesgo vascular y metabólico como la obesidad visceral, la hiperglucemia secundaria a resistencia a la insulina, la dislipemia y la hipertensión arterial. Debido a la creciente incidencia del síndrome metabólico en los países desarrollados, la NAFLD está emergiendo como una de las enfermedades hepáticas más frecuentes en nuestro medio.

1.1.2. EPIDEMIOLOGÍA

Aún hoy, la prevalencia e incidencia de NAFLD en la población general es mal conocida, debido a su carácter indolente y a menudo silente, a la ausencia de una metodología de cribado aceptada, a que su diagnóstico preciso requiere de un procedimiento agresivo (biopsia hepática) y a que no existe consenso sobre su caracterización, dosis mínima de alcohol ni gradación histológica.

Los estudios actuales muestran una gran heterogeneidad, pudiendo dividirse en dos categorías: a) estudios enfocados sobre subpoblaciones seleccionadas de pacientes y b) estudios poblacionales. Los primeros suelen asociarse a procesos clínicos concretos de una población (por ejemplo, obesos o diabéticos) y, por ello, con diferentes sesgos; mientras que los estudios poblacionales suelen utilizar técnicas de imagen para el diagnóstico, especialmente ecografía, lo que puede resultar idóneo para el diagnóstico de esteatosis, pero no para el de esteatohepatitis. Es por ello, que dichos estudios obligan a ser muy cautos en la interpretación de resultados.

En Europa, así como en el Reino Unido, el hígado graso no alcohólico se ha convertido en la causa más común de enfermedad hepática crónica, debido, entre otras razones, a una mayor conciencia general del problema. (3) (4)

De acuerdo con los datos de la US National Health and Nutrition Examination Survery (NHANES), el porcentaje de diagnóstico de hígado graso no alcohólico entre las enfermedades crónicas del hígado se incrementó del 47% al 75% entre 1988 y 2008. Durante el mismo período de tiempo, la prevalencia de cinco condiciones del síndrome metabólico también aumentó significativamente:

- La obesidad de 21% a 33%
- La obesidad visceral de 35% a 51%
- La diabetes tipo 2 desde el 5,6% hasta el 9,1%
- Resistencia a la insulina del 23% al 35%
- La hipertensión arterial del 22% al 34% (3)

La información disponible sobre la **incidencia de la NAFLD** es escasa y muy dispar. Por ejemplo, un estudio de salud realizado en empleados del gobierno japonés reveló una incidencia global de NAFLD con hipertransaminasemia de 31 casos por cada 1000 personas/ año, mientras que otro reciente estudio en Inglaterra reportó una tasa de incidencia de 29 casos por 100.000 personas/ año. La clara discrepancia entre las tasas de incidencia de ambos indica que son necesarios más estudios. (5)

Numerosos estudios epidemiológicos han observado que la **prevalencia de la NAFLD**, tanto de la esteatosis simple como de la esteatohepatitis, aumenta de manera directamente proporcional al índice de masa corporal (IMC), con cifras del 15% y del 3%, respectivamente, en personas no obesas; del 65% y del 20%, respectivamente, en

personas obesas, y llegando hasta el 85% y el 40%, respectivamente, en pacientes con obesidad mórbida. Un hecho destacable es que esta estrecha asociación epidemiológica aparece más con la obesidad visceral o abdominal que con el IMC. **(6)**

La diabetes mellitus tipo 2 es la segunda entidad que se asocia con mayor frecuencia con la NAFLD, alcanzando cifras de prevalencia de hasta el 70% en la población diabética. **(7)**

La dislipemia, fundamentalmente en forma de hipertrigliceridemia o bajas concentraciones séricas de colesterol HDL, es otra alteración metabólica que se observa en la mayoría de los casos de NAFLD. En estos pacientes con dislipidemia la prevalencia se ha estimado en torno a un 50%. **(8)** Un aspecto relevante es que, incluso en ausencia de obesidad y de diabetes, los pacientes con NAFLD tienen una elevada prevalencia/incidencia de síndrome metabólico, hasta el punto que algunos autores sugieren que la NAFLD no es una consecuencia sino más bien un desencadenante del mismo. **(9)**

Factores como la edad, el sexo y la etnia juegan un papel en la epidemiología: el sexo masculino, la edad avanzada, y origen hispano están asociados con un riesgo significativamente mayor de desarrollar NAFLD. **(10)** Los casos de esteatohepatitis con fibrosis avanzada y cirrosis son raros en adultos jóvenes, mientras que son más frecuentes entre la 6ª y 8ª décadas de la vida. **(11)** No obstante, la NAFLD no sólo afecta a los adultos sino también a los niños. Distintos estudios epidemiológicos han encontrado signos ecográficos y analíticos de NAFLD en el 3% de la población pediátrica general, llegando al 53% en los niños obesos. **(7)**

A nivel mundial, la prevalencia de NAFLD supuesta en la población general es de entre 6% y 33%, con una mediana de 20%. **(10) (12)**

Datos provenientes de estudios poblacionales estiman la prevalencia de NAFLD entre un 20-30% de la población en los países occidentales y un 15% en los países asiáticos. **(7)**

Hay multitud de estudios poblacionales realizados con *técnicas radiológicas*, sobre todo con ecografía. Un reciente estudio multicéntrico poblacional español basado en el diagnóstico ecográfico **(5)** detectó una prevalencia de NAFLD del 25.8%, con un 33% en hombres y un 20% en mujeres. El estudio DIONYSOS **(13)**, basado también en la ecografía, mostró que la prevalencia de NAFLD en sujetos italianos era del 26%. En el estudio SHIP, la prevalencia encontrada entre los alemanes fue del 30,4%. **(14)**

Aunque se aplica con menos frecuencia a los grandes estudios de detección de NAFLD que la ecografía, la resonancia magnética nuclear (RMN) se ha utilizado también para determinar la prevalencia de NAFLD. En los EE.UU., un estudio ampliamente citado de RMN del Condado de Dallas (Texas) identificó NAFLD en el 31% de una muestra con base poblacional en una sociedad multiétnica. **(15)**

Otros estudios de prevalencia utilizan determinaciones de *enzimas hepáticas* (alanina aminotransferasa -ALT- y la aspartato aminotransferasa -AST-) como indicadores no invasivos de NAFLD. Los datos del NHANES (1988-1994) reportaron niveles elevados de ALT en el 3% de la población, **(16)** con un incremento en los datos reportados en el período 1999-2002, estando la ALT elevada en el 7%, la AST en 4% y cualquier elevación ALT/AST en el 8%. **(17)** Una tasa mucho más alta se registra en una revisión retrospectiva de registros médicos electrónicos de los pacientes atendidos en el programa ejecutivo de salud del Hospital Johns Hopkins. En este estudio se registraron niveles elevados de AST en 2294 sujetos y niveles de ALT en 1309 de ellos. **(18)** Se observaron niveles elevados de enzimas hepáticas en el 14% de los sujetos no alcohólicos que tenían al menos una prueba, y el 21% de los sujetos no alcohólicos que tenían ambas pruebas. En otros estudios, la prevalencia de niveles elevados de ALT osciló entre el 8% y el 9%. **(12)** Al considerar los resultados de los estudios de población basados en parámetros analíticos como marcador de NAFLD, es prioritario interpretar con cautela los rangos de normalidad en los niveles de transaminasas. **(19)** **(20)** Es importante destacar que si bien los niveles de ALT elevados están generalmente asociados con NASH histológico, la sensibilidad de las transaminasas para detectar daño histológico o fibrosis, es baja. Por tanto, la ALT por sí sola no puede utilizarse para descartar enfermedad hepática significativa en pacientes con sospecha de NAFLD, especialmente aquellos con diabetes tipo II o hepatomegalia. **(21)**

Un estudio publicado por Powell y cols **(22)** comunicó que uno de cada tres adultos americanos presenta esteatosis simple, lo que supone que unos 70 millones de adultos presentan NAFLD. En este estudio, el 79% de los pacientes muestran niveles normales de transaminasas, concluyendo que la utilización de las transaminasas como parámetro diagnóstico de esteatosis podría infraestimar la verdadera prevalencia de la enfermedad.

Por otra parte, los estudios realizados mediante *autopsias o biopsias hepáticas* en donantes sanos de trasplante hepático, muestran un resultado mixto sobre la prevalencia de NAFLD.

Un estudio de la India informó sobre los hallazgos de 1230 autopsias de adultos: 195 de las mismas (16%), mostraron hígado graso. (23) Sólo el 5% de estos pacientes eran obesos y con un consumo elevado de alcohol.

Un estudio coreano en el que se realizó biopsia hepática de forma consecutiva en 589 posibles donantes de trasplante hepático, comunican una prevalencia de NAFLD del 51%. (24)

En Estados Unidos, un estudio similar reveló que el 20% de los donantes no cumplían los requisitos para la donación de órganos en base al grado de esteatosis (> 30%). (25)

La prevalencia por tanto, no sólo depende de la población a estudio, sino también del método del mismo, pudiendo observarse diferencias sustanciales. En relación a esto, otro enfoque interesante para toda la población pro-presentación de la prevalencia de NAFLD se basa en *combinaciones de variables clínicas* fáciles de medir. Los ejemplos de perfiles de NAFLD de este tipo incluyen *Fatty Liver Index (FLI)*, [IMC, circunferencia de cintura, triglicéridos y ácido gamma-glutamyl-transferasa (GGT)], (26) y *Lipid Accumulation Product (LAP)* (circunferencia de la cintura y triglicéridos en ayunas). (27) Estos índices son aplicables en comunidades con establecimientos de salud, y podrían contribuir a los estudios de prevalencia del NAFLD, pero hasta ahora sólo se han aplicado a las poblaciones preseleccionadas.

La **prevalencia del NASH** también es difícil de establecer ya que precisa un diagnóstico histológico. Actualmente, la prevalencia del NASH en la población general no está claramente definida. Un estudio en autopsias de la década de 1980 encontró que la prevalencia de NASH era de 2,7% en personas delgadas, aumentando a 18,5% en los pacientes obesos. (28) Más recientemente, tres estudios que evaluaron el hígado de donantes hepáticos encontraron una prevalencia de NASH del 1,1 % al 14%. Aunque estos estudios han sido los primeros en evaluar la prevalencia de NASH con criterios histológicos en individuos sanos, el sesgo del consumo de alcohol no fue analizado. (29) (30)

No hay datos para conocer la prevalencia de diabetes mellitus y NASH. (29)

1.1.3. ETIOPATOGENIA Y FISIOPATOLOGÍA

Desde el punto de vista etiológico, la NAFLD se asocia con una amplia variedad de procesos clínicos (**Tabla 1**) (**31**) (**32**) (**33**) y, tanto la patogenia como la prevalencia, historia natural y tratamiento, pueden ser muy diferentes para las distintas posibles causas.

Tabla 1. Factores etiológicos asociados a esteatohepatitis no alcohólica

Primaria: procesos o condiciones clínicas asociadas al síndrome metabólico	
<ul style="list-style-type: none"> • Obesidad • Diabetes mellitus tipo 2 • Hipertrigliceridemia • Hipertensión arterial 	
Secundaria	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Otros trastornos metabólicos adquiridos <ul style="list-style-type: none"> - Pérdida de peso intensa Por dieta o ayuno - Procedimientos quirúrgicos - Derivación intestinal (yeyunoileal) - Resección extensa de intestino delgado - Gastroplastia o derivación gástrica - Derivación biliopancreática - Kwashiorkor - Nutrición parenteral total - Déficit de colina ▪ Otros trastornos metabólicos congénitos y/o hereditarios <ul style="list-style-type: none"> - Lipodistrofia/lipoatrofia - Síndrome de Mauriac - Abeta e hipobetalipoproteinemia - Hepatoesteatosis familiar - Glucogenosis - Homocistinuria - Tirosinemia - Alteraciones hereditarias del metabolismo de la carnitina - Enfermedad de Wilson - Enfermedad de Weber-Christian - Enfermedad de Andersen ▪ Fármacos <ul style="list-style-type: none"> - Maleato de Perhexilina - Amiodarona - Glucocorticoides - Estrógenos sintéticos - Tamoxifeno - Cloroquina - Bloqueadores de los canales de calcio - Diltiazem - Sulfasalazina - Espironolactona - Metotrexato - Naproxeno - Oxakazina - Terapia antirretroviral de alta actividad ▪ Miscelánea <ul style="list-style-type: none"> - Exposición ocupacional o ambiental a hepatotóxicos - Diverticulosis yeyunal con sobrecrecimiento bacteriano - Enfermedad inflamatoria intestinal - Enfermedad celíaca - Síndrome de realimentación - Lipodistrofia parcial - Síndrome del aceite tóxico 	

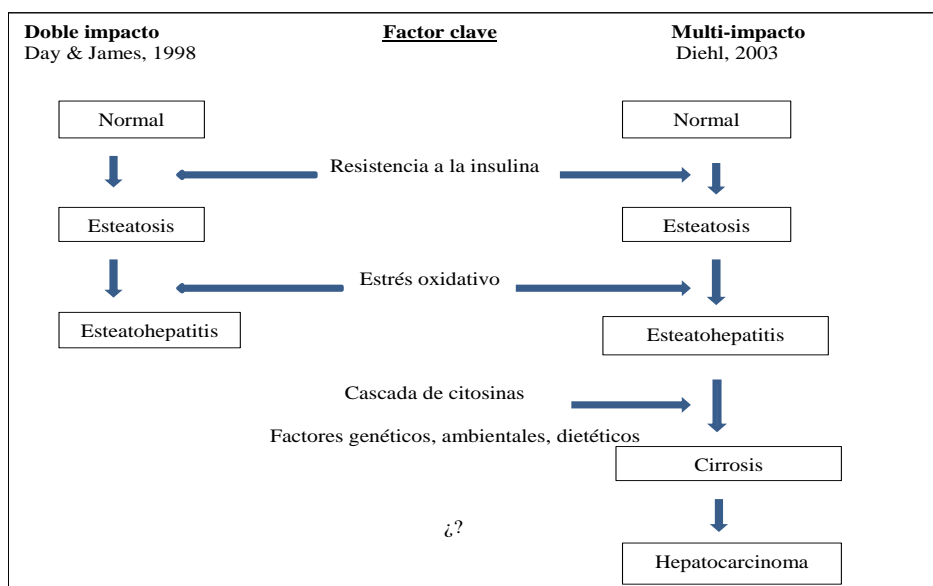
Aunque no es una diferenciación de aceptación unánime, es conveniente separar la NAFLD *primaria*, esto es, en la que no existe un agente etiológico aparente, de la NAFLD *secundaria*, en la que sí es posible individualizar un factor desencadenante concreto. La forma primaria forma parte del síndrome metabólico, mientras que la forma secundaria se ha descrito en un número elevado de diversas condiciones, como otros cuadros metabólicos, la cirugía bariátrica o algunos fármacos y tóxicos.

Las causas metabólicas primarias son, con diferencia, las más frecuentes.

La patogenia de la forma primaria es un tema controvertido y de conocimiento muy parcelario. En cualquier caso, se acepta un patrón multifactorial (34) (35) y su origen y evolución son el resultado de diversos acontecimientos, en especial dietéticos y de estilo de vida, que inciden en un contexto genético adecuado para promover múltiples alteraciones metabólicas e inmunológicas. (34) (36)

Se han postulado diversas teorías (Figura 1). La pionera fue la *teoría del “doble impacto”*, basada en el modelo propuesto por Day y James (37) en 1998. El primer impacto parece ser una resistencia a la insulina (RI) periférica con resultado de acumulación grasa en el hígado (esteatosis) y, el segundo, un estrés oxidativo crónico que conduce a una lesión hepatocelular y fibrosis (esteatohepatitis). Con posterioridad se han enunciado otras hipótesis en las que, además de esos dos impactos, se definen otros subsiguientes. Entre ellas se encuentra la *teoría del “multi-impacto”*, defendida por Diehl (36), que especifica la génesis de cirrosis (tercer impacto) y, eventualmente, de hepatocarcinoma (cuarto impacto).

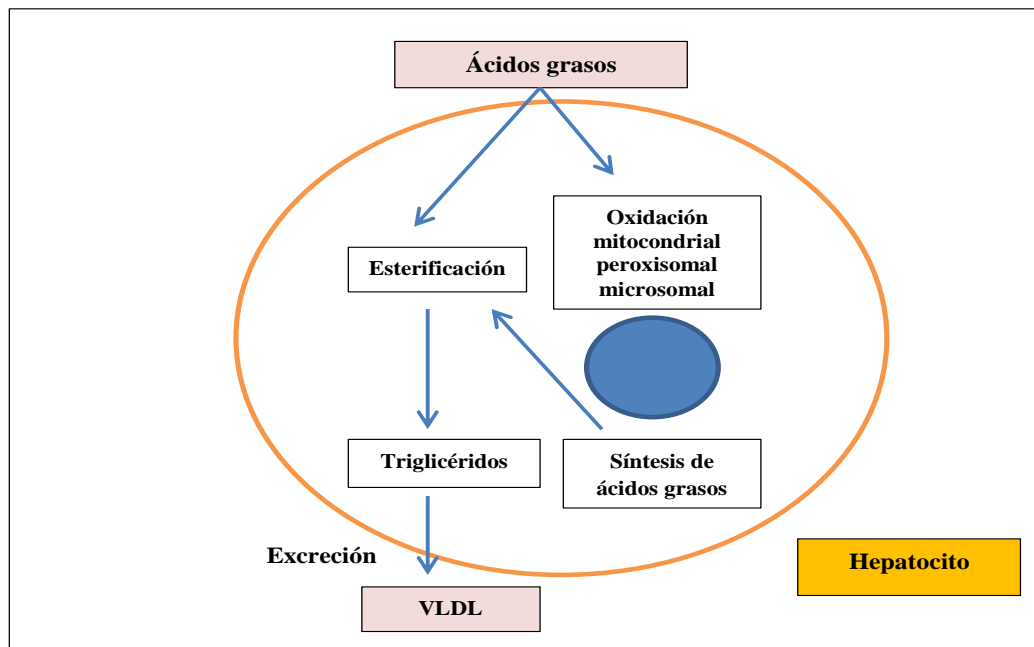
Figura 1. Teorías sobre patogenia de NAFLD primaria: del doble impacto por Day & James y del multi-impacto, según Diehl.



1.1.3.1. Primer impacto: progresión de hígado normal a esteatosis.

En condiciones fisiológicas, la homeostasis lipídica requiere de interacciones metabólicas coordinadas entre el hígado, el músculo y el tejido adiposo, ejercidas en gran medida por la acción reguladora de la insulina. El hígado tiene un papel central en el metabolismo de los lípidos: capta los ácidos grasos (AG) circulantes que proceden fundamentalmente del tejido adiposo y en menor medida de la absorción intestinal de la grasa de la dieta. Además, los hepatocitos pueden sintetizar AG de novo. Una vez en el hígado, los AG pueden seguir 2 vías fundamentales (**Figura 2**): incorporarse a las vías de oxidación intracelular para generar ATP o esterificarse para convertirse en triglicéridos y así secretarse a la sangre unidos a la apolipoproteína B100 y formar lipoproteínas de muy baja densidad o *very low density lipoproteins* (VLDL). Por tanto, aquellos procesos que aumenten la captación hepática de AG o alteren su metabolismo (síntesis, oxidación o esterificación) y su posterior secreción pueden producir una acumulación excesiva de grasas en el hígado, que son el primer “impacto” en el modelo patogénico de la NAFLD propuesto por Cristopher P Day y Oliver W James en 1998. (37)

Figura 2. Metabolismo normal de los lípidos en el hepatocito.



Se han descrito diversos polimorfismos y mutaciones genéticas que podrían inducir hepatopatía grasa por diferentes mecanismos. (38) (36) Entre los posibles causantes encontramos: a) genes que codifican la leptina y su receptor y en el gen del sustrato del receptor de la insulina (insulin receptor substrate o IRS) tipo 2, que

conllevarían a un aumento de la síntesis hepática de lípidos; b) en el gen de la palmitilcarnitina transferasa, que disminuiría la captación mitocondrial de AG; c) en los genes de la triglicérido transferasa, de la apoproteína E (apo-E) y de la proteína microsomal de transferencia de triglicéridos (MTTP), que reducirían la excreción de lipoproteínas por el hepatocito; d) en el gen del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) que induciría RI; e) en el gen codificante del receptor activado por el factor proliferante de peroxisomas alfa (PPAR- α), que llevaría a una disregulación de la oxidación de ácidos grasos, etc.

La inusitada velocidad de propagación de la obesidad como epidemia de países industrializados no puede ser explicada por un repentino incremento de mutaciones genéticas de los genes que controlan el metabolismo graso. Por el contrario, la rapidez del proceso debe ser explicado por la interacción entre una susceptibilidad genética más bien estable y unos factores epigenéticos más dinámicos que incluyen la dieta y el ejercicio físico.

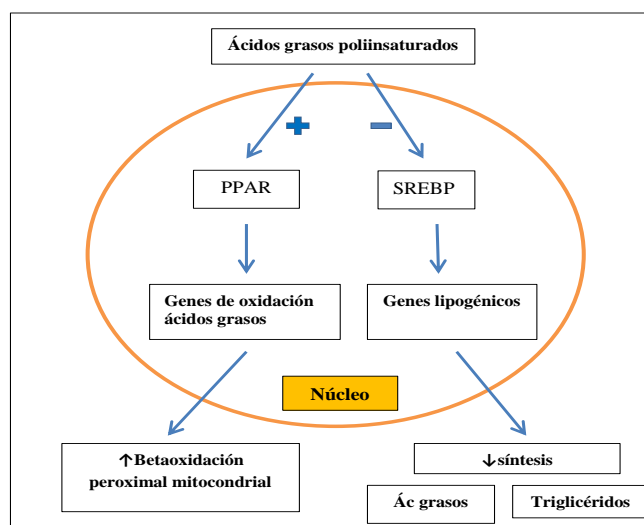
Algunos componentes de la dieta influyen en la actividad de factores de transcripción que regulan la síntesis de enzimas de la homeostasis lipídica (39), por lo que los cambios dietéticos influyen en la captación, síntesis, degradación y exportación de grasa por el hígado. Se ha observado que los pacientes con NASH realizan una dieta rica en grasas saturadas y colesterol y pobre en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) y vitaminas antioxidantes C y E. (40)

Los ácidos grasos poliinsaturados son ligandos de los PPAR- α , factores de transcripción que estimulan la expresión de genes que codifican enzimas de la betaoxidación peroxisomal y mitocondrial de ácidos grasos. Se conocen tres subtipos de PPAR: PPAR- α , PPAR- γ y PPAR- δ ; este último se expresa casi exclusivamente en el músculo y tiene un papel menos relevante. El subtipo α se expresa fundamentalmente en los tejidos que utilizan los AG como fuente de energía, como el hígado, el corazón, el músculo y el riñón. (41) Cuando la concentración hepática de AG aumenta, el PPAR- α se activa y promueve la transcripción de genes implicados en la betaoxidación mitocondrial, peroxisomal y microsomal (acil-CoA oxidasa y citocromo P450), así como en el transporte y la secreción de los AG del hígado (la proteína microsomal transportadora de triglicéridos y la apolipoproteína B100). (42) (43) Por tanto, el resultado final de su activación es el incremento del catabolismo hepático de AG.

Asimismo, los PUFA son moduladores negativos de la lipogénesis hepática, al parecer por inhibición de las proteínas de unión al elemento regulador de los esteroides

(sterol regulatory element binding protein, SREBP) tipo 1, a su vez factores de transcripción de enzimas lipogénicas. (44) (Figura 3).

Figura 3. Modulación de la expresión génica por los ácidos grasos poliinsaturados



La RI se considera en la actualidad el pilar patogénico básico de este “primer impacto”, ya que puede interferir en el metabolismo hepático de los AG a diferentes niveles (Figura 4).

El principal mecanismo que causa la acumulación hepatocelular de triglicéridos en humanos sería una RI a nivel del adipocito. (45) (46) (47) La razón biológica reside en un mecanismo de defensa del tejido adiposo esteatósico. El adipocito, con su capacidad endocrina, participa en la fisiología sistémica a través del llamado *sistema adipostático*. (48) (49) (50) Así, los efectos fisiológicos de la obesidad derivan de tres factores: a) el aumento de la masa de tejido adiposo, b) el incremento de producción-secreción, constitutivo, de sus productos propios o *adipocitocinas*, entre las que se encuentran la *leptina*, el *TNF- α* y la *interleucina (IL)-6*, (51) y, c) la hipoproducción paradójica de otras adipocitocinas como la *adiponectina*. (Figura 5).

El adipocito cargado de grasa, como célula activa, busca liberarse de ella. Entre varios posibles mecanismos, parece «elegir» el hacerse resistente a la acción de la insulina. La pérdida de la señalización insulínica en esa célula conduce a la activación mantenida mediante el glucagón y las catecolaminas de la lipasa adipocitaria insulinosensible, con la consecuente lipólisis e incremento del flujo de AG no esterificados (AGNE) al hígado. (52) La teoría más clásica sobre la patogenia de la esteatosis hepática, denominada “*teoría portal*”, atribuye un papel clave al tejido adiposo visceral como fuente principal de AGNE y *TNF- α* al hígado a través de la vena

porta. (53) Ciertamente, los pacientes con NAFLD tienen concentraciones séricas elevadas de AGNE (54), y la mayoría (60%) del contenido hepático de triglicéridos proviene del pool circulante de los AGNE, mientras que un 25% procede de la síntesis de novo de AG y un 15% de los AG de la dieta. (55)

La hiperinsulinemia y el aumento de la producción hepática de glucosa, que se producen como consecuencia de la RI, inducen la expresión de SREBP-1c y de la proteína de unión al elemento de respuesta a hidratos de carbono (ChREBP), respectivamente, que a su vez activan la transcripción de la mayoría de los genes que participan en la maquinaria enzimática necesaria para la síntesis hepática (de novo) de AG. (56).

Figura 4. Alteraciones metabólicas secundarias a la resistencia a la insulina que conducen a la acumulación de grasa en el hígado. La inducción de la lipogénesis de novo, mediada por la insulina y la glucosa, la inhibición de la β -oxidación mitocondrial por los AGNE, así como, fundamentalmente, el aumento del flujo y de la captación de AGNE circulantes contribuyen a la esteatosis hepática.

ACC: acetil-CoA carboxilasa; ACL: ATP citrato liasa; AGNE: ácidos grasos no esterificados; ChREBP: proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos; CPT-1: carnitina palmitoil transferasa-1; FAS: sintasa de ácidos grasos; IKK β : cinasa beta del inhibidor κ B; LCE: elongasa de ácidos grasos de cadena larga; LP: lipasa insulinosensible; NF- κ B: factor nuclear kappa B; SCD: estearoil-CoA desaturasa; SREBP: proteína de unión al elemento regulador de esteroides; VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad.

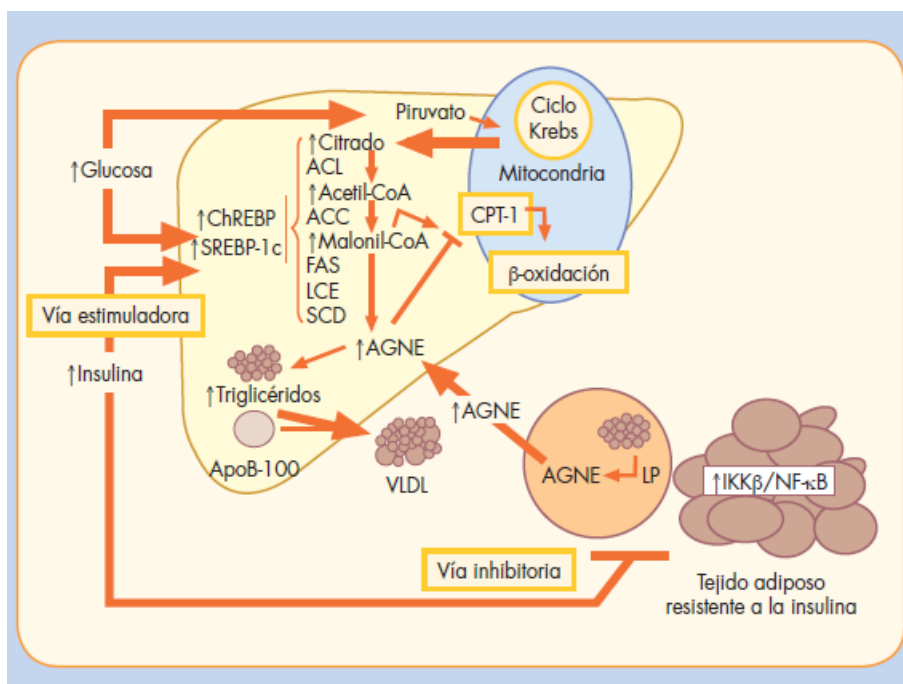
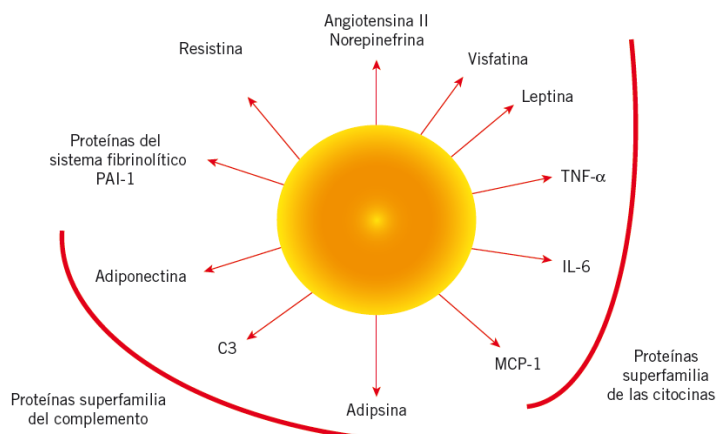


Figura 5. Clasificación de las adipocinas mejor caracterizadas.

Otro factor que parece participar en el incremento del contenido hepático de AGNE es la disminución de la β -oxidación mitocondrial. (57)

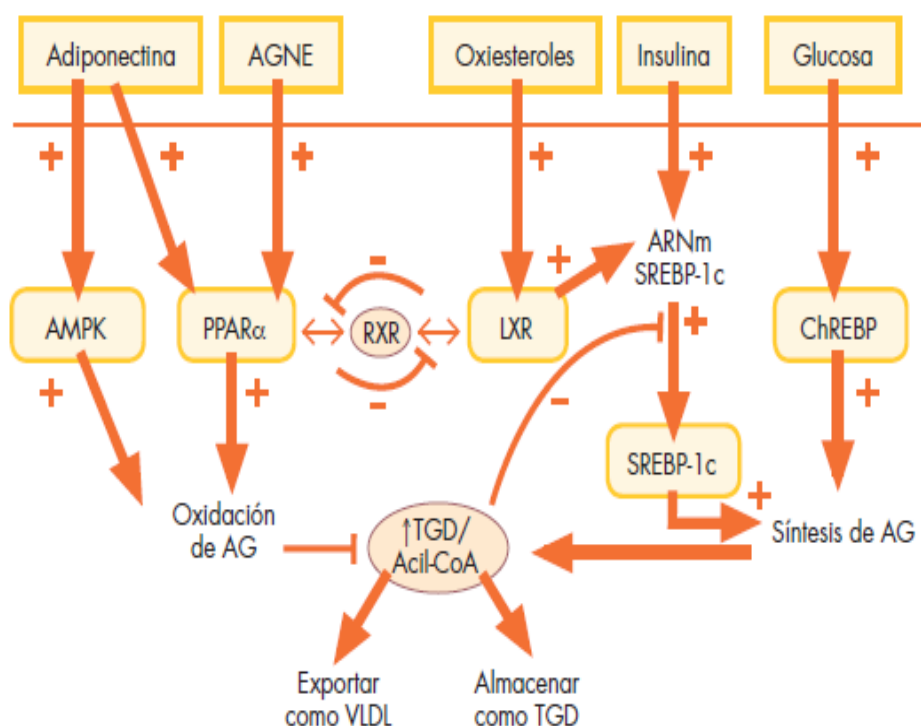
Se ha demostrado que la insulina inhibe esta vía fisiológica de oxidación hepática de AG al producir la activación, mediada por SREBP-1c, de la isoforma 2 de la acetil-CoA carboxilasa que produce malonil-CoA a nivel de la membrana mitocondrial. (58) El aumento de la síntesis de malonil-CoA disminuye la oxidación mitocondrial de los AG al inhibir la enzima carnitina palmitoiltransferasa que se encarga de transportar los AG de cadena larga desde el citoplasma al interior de la mitocondria. (59) El aumento de la lipogénesis hepática puede también contribuir, aunque de forma modesta como ya se ha mencionado, al acúmulo de triglicéridos. Se sabe que la síntesis de AG en el hígado está estrechamente regulada por una serie de moléculas mediadoras, como los PPAR, el *receptor X del hígado (LXR)* y la *proteína cinasa activada por AMP (AMPK)*. (56)

LXR, tras su activación por parte de ciertos ligandos, forma complejos heterodiméricos con el receptor X retinoide que se comportan como transactivadores de la transcripción de genes implicados en la síntesis de AG, como el SREBP-1c y el ChREBP, lo que podría contribuir a la esteatosis. (60) El LXR interacciona con el PPAR- α de una manera recíprocamente inhibitoria, de modo que los receptores ejercen funciones opuestas sobre el metabolismo lipídico. El LXR promueve la biosíntesis de

los AG mientras que el PPAR- α induce la oxidación de éstos. La competición por el receptor X retinoide disponible en el citoplasma de la célula es el exclusivo mecanismo que regula la activación de uno u otro receptor, que polarizan a la célula hacia la síntesis o hacia el catabolismo lipídico. **(Figura 6). (61) (62).**

Figura 6. Homeostasis hepática de los lípidos.

AGNE: ácidos grasos no esterificados; AMPK: cinasa activada por adenosinmonofosfato;
ChREBP: proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos;
LXR: receptor X del hígado;
PPAR α : receptor gamma de los ligandos de la proliferación peroxisomal;
RXR: receptor X retinoide;
SREBP: proteína de unión al elemento regulador de esteroles; TGD: triglicéridos.



La AMPK funciona como sensor de los niveles energéticos de la célula. Esta proteína cinasa se activa cuando aumentan los niveles intracelulares de AMP, lo que ocurre cuando disminuyen las reservas celulares de energía. La AMPK activada estimula las vías catabólicas de la célula que producen ATP, como la betaoxidación mitocondrial, e inhibe los procesos que consumen ATP, como la lipogénesis, directamente fosforilando proteínas reguladoras e indirectamente regulando la expresión de genes involucrados en estas vías metabólicas. **(63)** La composición de AG en el hepatocito puede modular la actividad de la AMPK. En ausencia de la enzima esteroil- CoA desaturasa, la AMPK

se activa (64) fosforilando e inhibiendo la acetil-CoA carboxilasa y la ChREBP (65) (66), así como disminuyendo los niveles de expresión de la SREBP-1c. (67) Las tiazolidindionas son fármacos antidiabéticos que se caracterizan por activar el PPAR- γ . Además, tanto estos fármacos como la metformina son capaces de activar la AMPK hepática. (67) (68) (69) Sus efectos beneficiosos en pacientes con NASH (70) (71) (72) serían en parte la consecuencia de unos acontecimientos moleculares que básicamente tienen que ver con la activación de la vía de la AMPK.

1.1.3.2. Segundo impacto: progresión de esteatosis a esteatohepatitis.

El conocimiento de los mecanismos implicados en la progresión de una esteatosis simple a una esteatohepatitis es importante para poder diseñar estrategias en el tratamiento y la prevención de los pacientes que tienen o están en riesgo de NASH.

Evidencias experimentales apuntan el importante papel que la **leptina** y la **adiponectina** podrían desempeñar en la patogenia del NASH. Se ha comprobado que la administración de leptina a pacientes y ratones con lipodistrofias congénitas que cursan con déficit o ausencia de leptina revierte el NASH. (73) (74) En cambio, en el NASH asociado a obesidad y RI, las concentraciones séricas de leptina están elevadas de manera proporcional al grado de esteatosis hepática. (75) (76) En estos pacientes parece existir un estado de “resistencia a la leptina” que acompaña a la RI y hace que el hígado se vuelva refractario a los beneficiosos efectos antiesteatósicos de la leptina. (75)

Está demostrado que las concentraciones séricas de adiponectina son inversamente proporcionales al grado de esteatosis hepática y el perímetro de la cintura. (48) Mientras que la concentración plasmática de TNF- α no difiere entre individuos con esteatosis simple y aquellos con NASH, una minoría (el 33%) de los pacientes con hígado graso tienen unas concentraciones plasmáticas de adiponectina por debajo de 10 microg/mL, mientras que la mayoría (un 77%) de aquellos con NASH tienen esos niveles por debajo de ese límite. (77) En la misma línea, otro estudio demostró que el nivel de expresión intrahepática de adiponectina y de su receptor tipo II era también menor en el NASH que en la esteatosis. (78) La adiponectina es una hormona antiesteatósica que promueve la betaoxidación mitocondrial de los AGNE y ejerce este efecto a través de la activación del PPAR- α y de la AMPK. (79) La adiponectina posee también un efecto antiinflamatorio que probablemente se deba a su capacidad para inhibir la síntesis y la secreción de TNF- α por parte de los macrófagos que infiltran el tejido adiposo en la obesidad. (80) Curiosamente, estos 2 factores se regulan

mutuamente su actividad biológica. El TNF- α inhibe la síntesis y la actividad de la adiponectina y ésta inhibe la síntesis y la actividad del TNF- α . Se ha comprobado que un mecanismo similar puede ser igualmente importante en humanos. (77)

Inicialmente se consideraron como los principales candidatos para el “segundo impacto” el estrés oxidativo, con la consiguiente peroxidación lipídica, y las citoquinas, fundamentalmente el TNF- α . En los últimos años se ha incrementado el conocimiento sobre las fuentes intracelulares de radicales libres y citoquinas y, en particular, del importante papel de la RI, de los AGNE y de la inflamación del tejido adiposo y hepático, lo que ha llevado a revisar el modelo patogénico original. Ha aparecido un tercer candidato potencial a “segundo impacto” patogénico: el estrés del retículo endoplásmico (RE), y también se ha puesto de manifiesto que la apoptosis es un fenómeno frecuente en el NASH. (81)

Los ácidos grasos de cadena corta, media y larga son betaoxidados por las mitocondrias y los de cadena larga y muy larga por los peroxisomas. Además, los de cadena larga y muy larga son omegaoxidados por el sistema microsomal del citocromo P450 (CYP) 2E1 y 3A4. Los sustratos de ese sistema incluyen a los ácidos grasos, el etanol y los cuerpos cetónicos. (82) El incremento de la actividad hepática de CYP 2E1 puede ser también resultado de la propia RI, pues su expresión está suprimida cuando la señalización insulínica está intacta. (83) No obstante y de manera inversa, también se ha descrito, en líneas celulares de ratones, que la sobreexpresión del CYP 2E1 induciría RI por una disminución de la fosforilación por tirosina del IRS-1 y del IRS-2. (84) La oxidación microsomal de ácidos grasos genera especies reactivas de oxígeno (ERO) por donación de electrones al oxígeno molecular. El CYP 3A4 hidroxila los ácidos grasos libres y los transforma en ácidos dicarboxílicos, que en roedores se degradan mediante la betaoxidación peroxisomal inducida por los PPAR- α . Sin embargo, en humanos esa inducción es defectuosa, por lo que aumenta la producción y disminuye la degradación de ácidos dicarboxílicos. (85) La deficiencia de enzimas de la betaoxidación de los ácidos grasos de cadena muy larga a nivel peroxisomal, como la acil-CoA oxidasa, interrumpe la oxidación de los mismos y de los ácidos dicarboxílicos y se ha reconocido como una importante causa de esteatosis microvesicular y esteatohepatitis (86) La pérdida de la citada enzima también origina una hiperactivación sostenida del PPAR- α , lo que conduce a sobreexpresión transcripcional de los genes dependientes del PPAR- α . (86)

Todo este complejo proceso oxidativo de los ácidos grasos tiene como consecuencia la formación de radicales libres del oxígeno (RLO) y ERO, de manera directa en la betaoxidación peroxisomal y en la omegaoxidación microsomal, pero, en mayor medida y de manera indirecta, en la betaoxidación mitocondrial. (87) (56)

Un radical libre (RL) se define como cualquier especie química (átomo, ion o molécula) capaz de existir de forma independiente y que presenta uno o más electrones desapareados en su estructura. Son en extremo reactivos y, en general, muy nocivos para la célula. El electrón no apareado puede pertenecer al oxígeno, y entonces es un RLO.

En términos generales, las fuentes endógenas principales de RLO y ERO son el sistema de transporte electrónico mitocondrial, diversas reacciones oxidativas microsomales y peroxisomales, las hemoproteínas y durante el proceso de fagocitosis. Cualquier situación que implique un aumento de la actividad de la cadena respiratoria supondrá un incremento en la formación de RLO/ERO, ya que, si bien la proporción a la que se generan es la misma, el volumen total es mayor. (88)

En el hígado esteatósico, como consecuencia de la oxidación de un exceso de AGNE en las células hepáticas, se produce un incremento de RLO/ERO que puede inducir lesión hepatocelular, inflamación y/o fibrosis al menos por tres mecanismos conocidos: *peroxidación lipídica*, *inducción de citocinas* y *expresión del ligando Fas*. (87) (89)

La **peroxidación lipídica** es uno de los más firmes candidatos como “segundo impacto” en la patogenia del NASH, ya que explicaría todas las lesiones histológicas características de esta enfermedad hepática. (Figura 7) (85) La peroxidación lipídica trae consigo, primero, un aumento de la permeabilidad de la membrana con balonización hepatocelular y, después, la necrosis. (87)

En la NASH, la peroxidación lipídica de membranas celulares y la muerte celular llevan a la producción y liberación, respectivamente, de los aldehídos 4-hidroxinonenal (HNE) y malondialdehído (MDA). (90)

Mientras que los RLO tienen una vida media corta y efectos sobre todo locales, los aldehídos reactivos tienen una vida media más larga y son capaces de actuar a mayor distancia, pueden formar aductos proteicos y actuar como antígenos e iniciar una respuesta inmune intrahepática, (91) pueden unirse a citoqueratinas hepatocelulares para forma hialina de Mallory y pueden estimular la quimiotaxis de los neutrófilos. (92)

En segundo lugar, los RLO/ERO funcionan como moléculas de señal y son capaces de activar la transcripción (93) (88) y, con ello, **inducir citosinas**. Así, son inductores del factor de transcripción NF- κ B, que a su vez actúa sobre algunos genes intrínsecamente ligados al fenómeno inflamatorio como los que codifican el TNF- α , el factor transformador del crecimiento beta (TGF- β) y la IL-8. (87) Además, se han encontrado marcadores de estrés oxidativo (p. Ej.: proteínas nitradas en tirosina) en modelos animales y en pacientes con NASH (94) (95) que relacionan la magnitud del estrés oxidativo con la gravedad de la enfermedad hepática. (96)

El TNF- α desempeña un importante papel en la patogenia de la RI sistémica y hepática, (97) y su producción es uno de los acontecimientos más precoces en muchos tipos de daño hepático, desencadenando la síntesis de otras citosinas que, juntas, reclutan a las células inflamatorias, necrosan hepatocitos e inician la respuesta curativa que incluye la fibrogénesis. (93) Así, las concentraciones séricas e intrahepáticas de TNF- α y de sus receptores están aumentadas en pacientes con NASH. (98) (77)

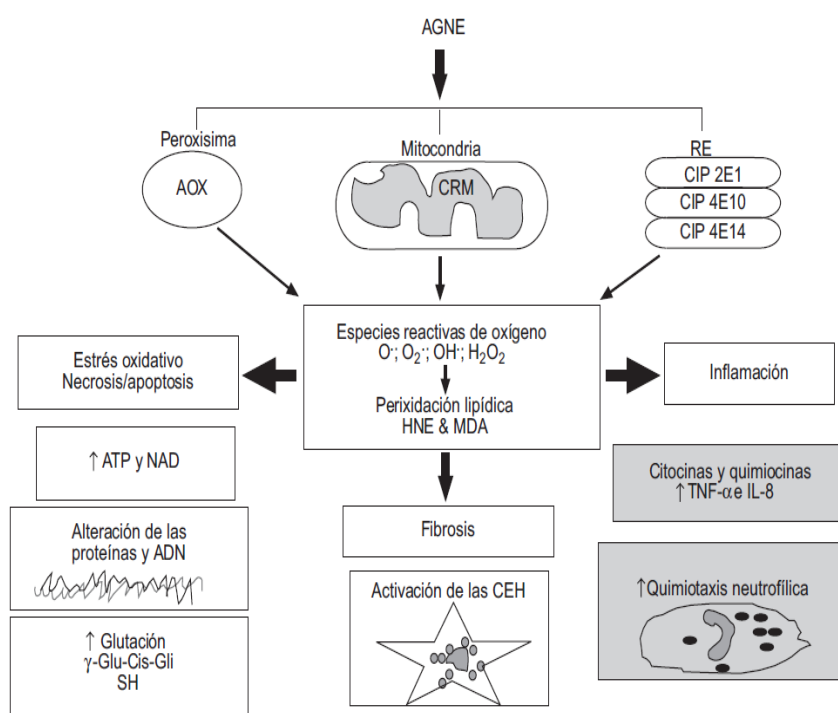
Otra citosina cuya síntesis promueve el NF- κ B es el TGF- β , que puede causar activación de la vía de las caspasas y muerte celular, (99) promoción de la síntesis de colágeno por las células estrelladas, (100) e inducción de la transglutaminasa tisular, que conglo mer a las proteínas del citosqueleto y lleva a la formación de hialina de Mallory. Por último, la IL-8 aumenta la quimiotaxis de neutrófilos y su contribución a la hiperproducción de RLO/ERO a través de la fagocitosis. (46)

Como se comentó anteriormente, un candidato potencial en la progresión de esteatosis a esteatohepatitis es el *estrés del RE*. El aumento de la concentración de AG, la hiperinsulinemia, la hipoxia y las infecciones víricas pueden alterar la homeostasis del RE y provocar lo que se denomina respuesta al estrés del RE, que provoca la activación de un número de factores de transcripción y cinasas. (101) Esta activación transcripcional conduce al aumento de la síntesis lipídica, inducción de apoptosis, inflamación y disfunción mitocondrial, (102) típicas alteraciones del NASH.

En tercer lugar, los RLO/ERO inducen la **expresión del ligando Fas** en el hepatocito. Las células hepáticas, en condiciones fisiológicas, poseen el receptor de membrana Fas. (103) (104) La expresión de su ligando por un hepatocito lo capacita para interactuar con el receptor de otro, lo que causa una muerte (*apoptosis*) «fratricida». Tanto el receptor Fas como el sistema enzimático apoptótico de las

caspasas están sobreexpresados en los hepatocitos de pacientes con NASH, en comparación con aquellos con esteatosis simple y con controles. (81)

Figura 7. Mecanismos del estrés oxidativo inducido por los ácidos grasos. El acúmulo de ácidos grasos no esterificados en el citosol incrementa la oxidación de éstos dentro de la célula. En las mitocondrias, la disfunción de la cadena respiratoria (CRM) conduce a la formación de aniones superóxido y peróxido de hidrógeno. La betaoxidación peroxisomal, iniciada por la enzima acil-CoA oxidasa, produce peróxido de hidrógeno, y la omegaoxidación en el retículo endoplásmico, catalizada por los citocromos, da lugar a diferentes especies reactivas de oxígeno. Estas y los productos finales de la peroxidación lipídica (4-hidroxinonenal y malondialdéhido) pueden provocar necrosis/apoptosis, inflamación y fibrosis.



Todos estos factores promoverían los fenómenos típicos de la esteatohepatitis: a) apoptosis/necrosis celular (RLO/ERO, ligando Fas, TNF- α , TGF- β); b) inflamación de predominio polimorfonuclear (HNE e IL-8), y c) fibrosis (MDA, HNE, TNF- α y TGF- β), poniendo en juego las *defensas antioxidantes* que conducen, finalmente y tras un proceso crónico, a la depleción de los antioxidantes intracelulares, como la vitamina E, (105) la superóxido dismutasa (106) y sus cofactores, como el glutatión. (94)

Otro mecanismo patogénético propuesto para el desarrollo de NASH es el hiperaflujo de **hepatotoxinas por vía portal** a un hígado vulnerable por el exceso de

grasa acumulada. (107) La obesidad se ha relacionado con una disminución de la motilidad intestinal, (108) lo que podría predisponer al sobrecrecimiento bacteriano. La flora bacteriana intestinal es una potencial fuente de endotoxinas y de alcohol por desdoblamiento de los carbohidratos en la luz intestinal. Así, en individuos con NASH se ha descrito tanto un sobrecrecimiento intestinal (109) como la generación endógena de alcohol. (108)

1.1.3.3. Tercer impacto: fibrogénesis.

Algunos autores defienden la existencia de otros impactos o factores adicionales para el desarrollo de fibrosis, (36) dado que sólo una minoría de pacientes con NASH progresan a cirrosis. (110)

Las células estrelladas y sus tipos celulares relacionados (miofibroblastos) son el origen principal de la matriz extracelular hepática. Ante una agresión, se activan y se transforman desde una célula quiescente a un tipo celular con alto poder proliferativo, fibrogénico y contráctil.

Las células estrelladas hepáticas (CEH) están activas en la NASH. (111) La activación inicial parece depender de los RLO/ERO (38) y de los productos de la peroxidación lipídica, en especial del HNE (112) (113) (100) que estimula la expresión del gen del colágeno α -1 y la producción de TGF- β 1 por los macrófagos.

La leptina es esencial para que se produzca fibrosis hepática en modelos animales de NASH. (79) El ratón ob/ob, deficiente en leptina, no desarrolla fibrosis incluso cuando se alimenta con una dieta fibrogénica, pero, en pacientes con NASH, las concentraciones séricas de leptina están elevadas aunque sin una clara asociación con el estadio fibrótico de la enfermedad hepática. (76) También se ha visto que la angiotensina II y la norepinefrina pueden activar la fibrogénesis in vitro y en ratones ob/ob deficientes en leptina. (114) (115)

Por último, la RI, aparte de sus efectos metabólicos, y a través de la activación del factor de crecimiento de tipo insulínico-1 (IGF-1), puede promover la fibrogénesis tras estimular la síntesis del factor de crecimiento del tejido conectivo en las CEH in vitro. (116) Además, la expresión intrahepática de este factor de crecimiento se correlaciona positivamente con el estadio fibrótico de pacientes con NASH, (116) lo que indica que la hiperinsulinemia y la hiperglucemia podrían jugar un importante papel en la progresión de la fibrosis hepática en estos pacientes. Quizá, estos efectos

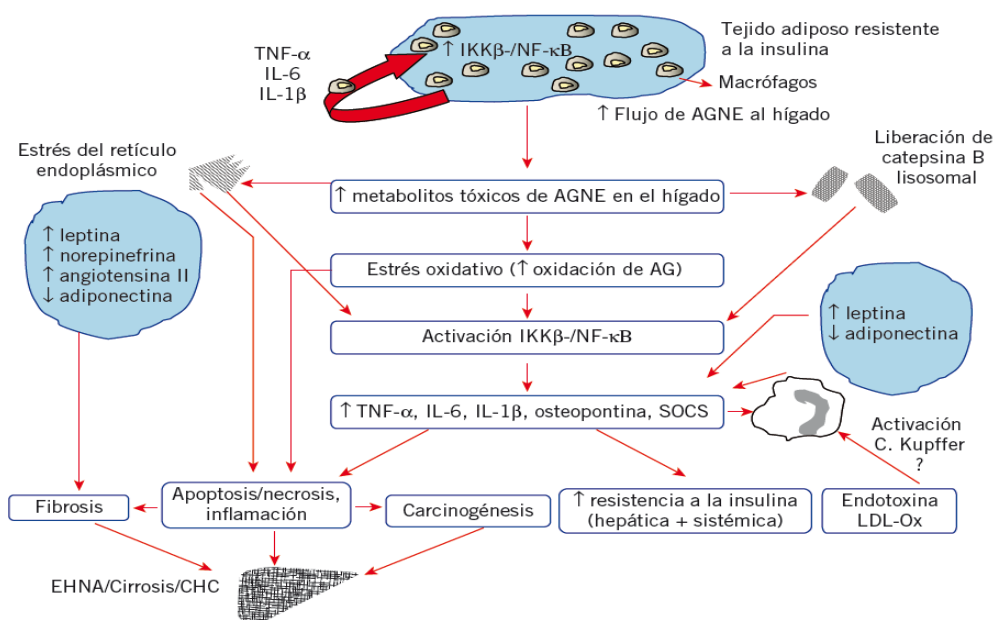
proliferativos participarían en la fibrosis y el desarrollo de hepatocarcinoma, respectivamente. **(Figura 8)**

Figura 8. Esquema integrado del modelo patogénico del NASH.

El incremento del aporte hepático de AGNE, como consecuencia de la lipólisis mantenida del tejido adiposo, genera metabolitos tóxicos que inducen la liberación de catepsina B lisosomal y estrés del retículo endoplásmico en el hepatocito, contribuyendo a la muerte celular por apoptosis y necrosis y a la inflamación. Además, el estrés oxidativo inicia la lipoperoxidación de las membranas y activa la cascada de señalización mediada por NF κ B, lo que se traduce en la transcripción de citosinas, como TNF- α e interleucina 6 (IL-6), y de proteínas supresoras de la señalización de citosinas (SOCS), que son determinantes en los mecanismos de RI, apoptosis, inflamación y fibrosis. Tanto los macrófagos del tejido adiposo como las células de Kupffer del hígado pueden también producir TNF- α tras la estimulación de toxinas bacterianas y otras sustancias procedentes del intestino.

Finalmente, desde el tejido adiposo, el aumento de la secreción de leptina y otras adipocinas así como la disminución de adiponectina contribuyen al daño hepático característico de NAFLD.

EHNA: esteatohepatitis no alcohólica; CHC: carcinoma hepatocelular; LDL-Ox: lipoproteínas de baja densidad oxidadas.



1.1.4. DIAGNÓSTICO

1.1.4.1. Clínica

La NAFLD es una enfermedad fundamentalmente asintomática, por lo que el diagnóstico de esta hepatopatía debe sospecharse en los pacientes que no consumen alcohol (menos de 3 unidades de bebidas alcohólicas estándar al día en hombres y menos de 2 al día en mujeres) y presentan algún factor de riesgo, especialmente obesidad, diabetes mellitus tipo 2, hipertrigliceridemia, pérdida rápida de peso o cirugía reciente para el tratamiento de la obesidad mórbida. También debe considerarse en sujetos con una elevación persistente y moderada de las transaminasas de causa no aclarada o que presentan una hepatomegalia aislada. **(117)**

En la exploración física la hepatomegalia es el hallazgo más frecuente (33-55%) y, en general, el único. La presencia de acantosis nigricans (36-49%), que se ha descrito solamente en niños, (118) (119) consiste en un engrosamiento e hiperpigmentación de la piel de localización intertriginosa. Ha sido considerada como un marcador de hiperinsulinemia y de resistencia a la insulina.

Otros signos, como son la esplenomegalia, la presencia de borde hepático duro, eritema palmar y teleangiectasias, sugieren la presencia de una enfermedad hepática avanzada con evolución cirrótica.

1.1.4.2. Laboratorio

Hasta el 80% de los pacientes con NAFLD tienen las concentraciones séricas de las enzimas hepáticas dentro de los límites normales, independientemente de si se trata de una esteatosis simple o una esteatohepatitis. (7)

De existir una elevación de las transaminasas, el cociente alaninoaminotransferasa (ALT, GPT)/ aspartatoaminotransferasa (AST, GOT) es superior a 1, diferenciándose de la hepatitis alcohólica en la que el cociente es <1. Es igualmente habitual una elevación moderada de la fosfatasa alcalina (FA) y de la Gamma-glutamyl-transpeptidasa (GGT). No obstante, como se ha comentado previamente, la hipertransaminasemia es un rasgo que tiene poca sensibilidad para el diagnóstico de NAFLD.

El resto de pruebas de la función hepática son normales, excepto en aquellos pacientes con una cirrosis establecida con datos de insuficiencia hepática, en la que presentan elevación de la bilirrubina, descenso de la albúmina y de la tasa de protrombina, y trombopenia. Es común encontrar alteraciones bioquímicas que se relacionan con las comorbilidades que se asocian con la NAFLD/NASH, particularmente la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2. En este sentido, es frecuente la alteración de los lípidos séricos, especialmente la hipertrigliceridemia y el descenso de los valores de colesterol HDL, así como la hiperglucemia y la hiperinsulinemia o, al menos, la RI determinada por el HOMA-R. La ferritina sérica en ocasiones está elevada en los pacientes con NAFLD, por lo que en estos casos se debe analizar la saturación de transferrina y, si está anormalmente aumentada, realizar el genotipado del gen de la hemocromatosis hereditaria.

Dado que la NAFLD puede coexistir con otras enfermedades crónicas del hígado, es imprescindible descartarlas mediante determinaciones bioquímicas e

inmunoserológicas que incluyan marcadores víricos, autoanticuerpos, cupremia y ceruloplasmina, alfa-1-antitripsina, hormonas tiroideas y anticuerpos antiendomisio o antitransglutaminasa. También debe descartarse de manera cuidadosa el consumo de alcohol y fármacos potencialmente hepatotóxicos.

1.1.4.3. Métodos de imagen

Tanto la *ecografía abdominal (US)* como la tomografía computarizada y la resonancia magnética son técnicas que permiten observar con facilidad y fiabilidad la existencia de un depósito aumentado de grasa en el hígado. Sin embargo, estas pruebas de imagen no permiten diferenciar la esteatosis simple de la esteatohepatitis con o sin fibrosis. (120) De entre ellas, la ecografía es la técnica más asequible y económica y, por tanto, sería la técnica a utilizar en primer lugar. Aunque el depósito de grasa en el hígado suele ser difuso, observándose en este caso un aumento de la ecogenicidad hepática que confiere al hígado un aspecto brillante, en ocasiones la esteatosis puede ser focal y dar falsas imágenes sugestivas de lesiones nodulares. A pesar de que la utilización de nuevas técnicas (como el uso de eco-potenciadores) ha mejorado la sensibilidad en el diagnóstico de cirrosis, (121) la utilidad de la US disminuye en los casos en los que la esteatosis es inferior al 30% (122) o cuando existe una obesidad mórbida. (123) En estos casos, la *tomografía axial computarizada (TAC)* y la *resonancia magnética (RMN)* pueden ser de utilidad. En fases avanzadas de la enfermedad, las pruebas de imagen también pueden mostrar cambios sugestivos de cirrosis o signos de hipertensión portal. Existen nuevas pruebas de imagen como la espectroscopia protónica por resonancia magnética y la elastografía transitoria que parecen muy prometedoras para la valoración de la esteatosis y de la fibrosis, respectivamente, pero aún necesitan ser validadas mediante estudios clínicos en grandes poblaciones de pacientes antes de su implementación en la práctica clínica. (7)

1.1.4.4. Biopsia hepática

La historia clínica, las pruebas de laboratorio y algunas pruebas de imagen ayudan a seleccionar aquellos casos que pueden beneficiarse de una biopsia hepática (BH), prueba “gold estándar” que permite efectuar un diagnóstico de certeza de NAFLD/NASH y establecer un pronóstico con mayor fiabilidad. (32) (124) (34)

La principal característica histológica de la NAFLD es el acúmulo de grasa en los hepatocitos, fundamentalmente triglicéridos, lo que se denomina esteatosis. La

presencia de más de un 5% de hepatocitos esteatósicos es el criterio mínimo para el diagnóstico histológico de esteatosis hepática.

Para la esteatohepatitis, los criterios mínimos para el diagnóstico histológico incluyen la presencia de esteatosis, daño hepatocelular, generalmente en forma de degeneración balonizante, apoptosis o necrosis, e infiltración inflamatoria lobulillar. La presencia de fibrosis es frecuente en la NASH, pero no es un requisito necesario para el diagnóstico histológico. **(125)** Cuando se establece una cirrosis tanto la esteatosis como los cambios inflamatorios pueden haber desaparecido, por lo que el diagnóstico etiológico debe hacerse por exclusión de otras causas y presentar el paciente alguno de los factores asociados.

La BH sirve para establecer la *gravedad de las lesiones* y, en este sentido, se ha propuesto una clasificación que es aceptada por la mayoría de autores y de la que hablaremos más adelante.

La BH hepática también puede ser útil para el *diagnóstico diferencial* entre el NAFLD y otras causas de elevación aislada de transaminasas, especialmente en aquellos pacientes sin componentes del síndrome metabólico. En ocasiones la confirmación histológica de que existe una esteatosis simple sin fibrosis, puede ser importante para definir el pronóstico. Finalmente y dada la mala correlación entre expresividad clínica y biológica y la intensidad de las lesiones hepáticas, la biopsia es necesaria en el momento de incluir a un paciente en un *estudio terapéutico* con el fin de obtener grupos homogéneos de pacientes. En estos casos lo ideal es repetir una biopsia al final del tratamiento para valorar los efectos de la medicación ensayada.

A pesar de todo lo anterior, la necesidad de BH en el manejo de los pacientes con NAFLD es todavía objeto de controversia. **(Tabla 2)**. Dada la alta prevalencia de hígado graso no alcohólico en la población general y el hecho de que la mayoría de los pacientes presentan esteatosis simple o esteatohepatitis de bajo grado, **(28)** la biopsia hepática puede no ser la opción más adecuada para muchos de estos pacientes. Por otra parte, a pesar de la confirmación histológica, no existe tratamiento bien establecido y la biopsia es una técnica con un coste y un riesgo que debe ser tenido en cuenta. Otra limitación adicional de la BH es el posible *error de muestra*. Un estudio reciente ha mostrado que un 35% de pacientes con NASH y fibrosis en puente en una muestra de biopsia, tenían sólo una fibrosis leve o ausencia de fibrosis en otra muestra de hígado

obtenida simultáneamente. (126) Finalmente la BH sólo ofrece información del estado del hígado en un momento determinado de un proceso muy dinámico y cambiante.

Tabla 2. La biopsia hepática en el hígado graso no alcohólico.

BIOPSIA HEPÁTICA EN NAFLD
<u>Ventajas</u>
<p>Confirmar el diagnóstico</p> <p>Diferenciar entre esteatosis simple y esteatohepatitis</p> <p>Establecer la gravedad de las lesiones (grado, estadio)</p> <p>Descartar enfermedades hepáticas de otra etiología</p> <p>Seleccionar grupos homogéneos de pacientes para estudios terapéuticos</p> <p>Evaluar el resultado de nuevos tratamientos</p>
<u>Limitaciones</u>
<p>Coste</p> <p>Morbilidad</p> <p>Proporcionar información puntual de un proceso dinámico</p> <p>Error de muestra</p>

Ha habido varias **definiciones de NASH** desde el punto de vista histológico. *Brunt y cols*, (127) en 1999 propusieron una clasificación semicuantitativa del *índice de actividad histológica* de la NAFLD, que se basaba en la distinción de 4 grados de

Tabla 3. Índice de actividad histológica del NASH propuesto por Brunt y cols.

GRADO
<p>1. Esteatosis macrovesicular</p> <p>Grado 0: No</p> <p>Grado 1: < 33%</p> <p>Grado 2: 33-66%</p> <p>Grado 3: > 66%</p> <p>2. Actividad necroinflamatoria</p> <p>Grado 1 (leve): esteatosis < 66%, algunos hepatocitos balonizados (zona 3), escasos neutrófilos +/- linfocitos (zona 3), inflamación portal mínima o inexistente.</p> <p>Grado 2 (moderada): esteatosis, abundantes hepatocitos balonizados (zona 3), inflamación portal.</p> <p>Grado 3 (intensa): esteatosis pantolobulillar, degeneración balonizante difusa, infiltración difusa por neutrófilos, inflamación portal.</p>
ESTADÍO
<p>0. Sin fibrosis</p> <p>1. Fibrosis perisinusoidal/pericelular (zona 3)</p> <p>2. Fibrosis perisinusoidal/pericelular (zona 3) y fibrosis portal o periportal.</p> <p>3. Fibrosis perisinusoidal/pericelular (zona 3) y fibrosis portal y fibrosis en puentes focal o extensas.</p> <p>4. Cirrosis</p>

esteatosis, 3 de actividad necroinflamatoria y 4 estadios de fibrosis, que se puntúan de menos a más dependiendo de la severidad de las lesiones histológicas. (Tabla 3)

Otros autores, (110) han clasificado la NAFLD en 4 tipos: tipo 1: esteatosis simple; tipo 2: esteatosis + inflamación lobulillar; tipo 3: esteatosis + degeneración balonizante; y tipo 4: esteatosis + degeneración balonizante + hialina de Mallory o fibrosis.

Recientemente Kleiner y cols, (126) proponen un sistema validado de puntuación para el diagnóstico de las lesiones de NAFLD y NASH, que se apoya y redefine el índice ya descrito por Brunt y cols (127) en 1999. En particular, el estadio de fibrosis fue subdividido y los grados de esteatosis fueron cambiados. Así, esta reciente clasificación describe 14 características histológicas de las cuales, 4 son evaluadas de forma semicuantitativa: esteatosis (0-3), inflamación lobular (0-3), balonización hepatocelular (0-2) y fibrosis (0-4).

De acuerdo con este sistema, el diagnóstico de esteatohepatitis vendría dado por la suma total de los puntos de cada ítem recogido en la tabla. Así, se considera probado “**diagnóstico de NASH**” cuando existen ≥ 5 puntos, “no diagnóstico de NASH” cuando presenta 0-2 puntos y “bordeline o posible NASH” cuando la puntuación se encuentra entre 3 y 4.

1.1.4.5. Marcadores serológicos indirectos

En los últimos años están cobrando importancia la aplicación de fórmulas matemáticas basadas en combinaciones de variables clínicas y analíticas fáciles de medir, para **evaluar NAFLD**. Algunas de ellas son **Fatty Liver Index (FLI)**, [IMC, circunferencia de cintura, triglicéridos y ácido gamma-glutamyl- transferasa (GGT)], (26) y **Lipid Accumulation Product (LAP)** (circunferencia de la cintura y triglicéridos en ayunas). (27) Estos índices tendrían aplicabilidad en estudios poblacionales de prevalencia de NAFLD, pero hasta ahora sólo se han aplicado a las poblaciones preseleccionadas.

También se han analizado diferentes combinaciones de variables para el **diagnóstico de NASH**. Entre ellas destacan el **SteatoTest** y el **Nash- Test (Biopredictive®)**. El Nash-Test incluye 13 parámetros (edad, sexo, IMC, colesterol, triglicéridos, GOT, GPT, GGT, bilirrubina, alfa 2 microglobulina, haptoglobina y apolipoproteína A1) que presenta alta especificidad, aunque su sensibilidad es discreta. Otro modelo, que combina 5 variables (edad > 50; GOT > 45; IMC > 30; relación GOT/GPT > 0,8; ácido hialurónico > 55) predice la presencia de NASH con elevada fiabilidad siempre que estén presentes 3 o más de estos factores. (128)

Shimada y cols. (129) han desarrollado otro modelo predictivo de NASH en pacientes con esteatosis hepática basándose en la combinación de adiponectina, HOMA-IR y colágeno sérico de tipo IV; quizás el dato más interesante de este estudio es la posibilidad de establecer un diagnóstico precoz, ya que es capaz de detectar a cerca del 90% de los pacientes con NASH. En pacientes obesos con NAFLD, un sencillo

score clínico (incluyendo HTA, DM tipo 2, SAOS, GOT > 27 UI/L, GPT > 27 UI/L y raza no negra) es capaz de predecir la presencia de NASH. (130)

Como se ha comentado anteriormente, los niveles de séricos de aminotransferasas y las pruebas de imagen no son fiables para evaluar la esteatohepatitis y la fibrosis en pacientes con NASH. Disponer de pruebas diagnósticas no invasivas que permitan diagnosticar con fiabilidad o excluir fibrosis avanzada sería beneficioso tanto desde el punto de vista clínico como económico. En este sentido ha habido un interés creciente en la utilización de biomarcadores y en el desarrollo de **modelos predictores de fibrosis avanzada en pacientes con NASH**. (131) (132)

La combinación de marcadores en modelos matemáticos ha mejorado la sensibilidad de los test individuales. El **FibroTest** ha sido uno de los primeros modelos para la predicción del grado de fibrosis, que presenta aceptables valores predictivos positivo y negativo. La necesidad de pago para su cálculo y la utilización de marcadores que generalmente no se utilizan en la práctica diaria disminuyen su utilidad.

Los **índices de APRI** ($\text{AST (UI/L)} / 35 \text{ (ULN*)} / \text{plaquetas (109/litro)} \times 100$. (ULN: se estima en 35 U/L el valor máximo normal de AST) (133) y **Forns** comparten la utilización de variables comúnmente utilizadas en la práctica diaria para elaborar sus modelos predictivos pero se han validado para pacientes con hepatitis por VHC. (134) El **índice del European Liver Fibrosis Group (ELFG)** valora la combinación de los niveles de ácido hialurónico, PIIINP, TIMP-1 y la edad. La sensibilidad para la detección de fibrosis significativa (> F2-F4) es del 90%, resultados recientemente validados. (135) El **NAFLD Fibrosis Score** se basa en seis variables fácilmente disponibles (edad, IMC, hiperglucemia, recuento de plaquetas, albúmina, cociente AST/ALT) (**Tabla 4**). En un meta-análisis de 13 estudios sobre 3064 pacientes, (131) NAFLD Fibrosis Score obtuvo un área bajo la curva ROC de 0,85 para la predicción de fibrosis avanzada (es decir, fibrosis o cirrosis) y un score <-1,455 tenía un 90% de sensibilidad y 60% de especificidad para excluir fibrosis avanzada, mientras que un score > 0,676 tenían 67% sensibilidad y 97% de especificidad para identificar la presencia de fibrosis avanzada. (136)

Tabla 4. Fórmula de NAFLD score.

$\text{NAFLD} = -1.675 + 0.037 \times \text{Edad (años)} + 0.094 \times \text{IMC (kg/m}^2\text{)} + 1.13 \times$ $\text{IFG/diabetes (sí = 1, no = 0)} + 0.99 \times \text{AST/ALT ratio} - 0.013 \times \text{plaquetas (}\times 10^9/\text{l)} - 0.66 \times \text{albúmina (g/dl)}$
$\text{NAFLD Score} < -1.455 = \text{F0-F2}$
$\text{NAFLD Score } -1.455 - 0.675 = \text{indeterminado score}$
$\text{NAFLD Score} > 0.675 = \text{F3-F4}$

Una de las principales limitaciones de estos modelos de predicción es que en gran parte han sido investigados en estudios de corte transversal y por lo tanto su utilidad en el seguimiento de la historia natural de la enfermedad, en predecir resultados o en la respuesta a la intervención terapéutica es desconocido. (132) Por otra parte, muchos de estos scores utilizan en su cálculo parámetros no accesibles en práctica clínica habitual.

Además de los marcadores que son capaces de detectar la presencia de fibrosis, en los últimos años se han evaluado diferentes biomarcadores (solos o agrupados en paneles) útiles para **diferenciar entre pacientes con esteatosis hepática simple y**, por lo tanto, con escasa capacidad de progresión, **de aquellos pacientes con NASH**, independientemente de la presencia o ausencia de fibrosis. En este sentido, el análisis de los fragmentos de la **citoqueratina 18** (CK-18), un marcador de apoptosis, ha demostrado una clara utilidad para diferenciar entre los sujetos con esteatosis simple de aquellos con NASH, con una elevada sensibilidad y especificidad. (137) Además, la concentración sérica de la CK-18 se correlaciona, de forma moderada, con los cambios histológicos en la actividad del NASH. (138) Tanto la **PCR ultrasensible** como la **petraxina 3** ayudan en la diferenciación entre NAFLD y NASH, aunque también se pueden elevar en otras enfermedades caracterizadas por un estado inflamatorio crónico. (139) (140).

1.1.4.6. OWLIiver Test

La metabolómica es el estudio de pequeñas moléculas orgánicas (<1000 Da), denominadas metabolitos, presentes en un sistema biológico. En la actualidad una de las principales utilidades en este campo son los perfiles metabólicos. La comparación de perfiles de distintos fenotipos se utiliza para identificar cambios metabólicos que nos ayudan a conocer la fisiología, toxicología y la forma en la que se desarrolla una enfermedad. Es por ello por lo que el emergente campo de la metabolómica tiene el potencial de proporcionar nuevas herramientas de diagnóstico de NAFLD. (141) (142)

Una de las grandes ventajas de la metabolómica es el hecho de que los metabolitos son menos especie-dependientes que los genes o las proteínas, facilitando la comparación directa de modelos animales con estudios en humanos. **(143)**

En este sentido, todas las características bioquímicas e histológicas observadas en humanos con NAFLD se han reproducido en el modelo de ratón Glicina N-metiltransferasa Knockout (GNMT-KO), tras perturbaciones en el metabolismo de la metionina. La enzima metionina adenosiltransferasa (MAT) cataliza la síntesis de S-adenosilmetionina (SAME) a partir de metionina en el hígado. **(144)** SAME es anti-apoptótica en hepatocitos normales y pro-apoptótica en células hepáticas cancerígenas. **(145)** Tanto el exceso como el déficit de SAME induce NASH. **(146) (147) (148)** La GNMT es la metiltransferasa hepática que cataliza la conversión de SAME en S-adenosil (SAH), un potente inhibidor de las reacciones de metilación. Por tanto, la importancia de la enzima GNMT es mantener una relación constante SAME / SAH, evitando así los eventos de metilación aberrantes. **(149) (150) (151) (152)**

En ratones GNMT-KO se objetivan una ALT, AST y SAME séricas elevadas, con el consecuente desarrollo de esteatosis hepática, fibrosis, y carcinoma hepatocelular. **(153)**

Otra prueba que apoya la idoneidad del modelo GNMT-KO para la comparación con NAFLD humano es el hallazgo de que niños con mutaciones GNMT padecían enfermedad hepática grasa leve-moderada. **(154) (155)**

La metabolómica es particularmente adecuada para la evaluación de lesiones hepáticas prevalentes, ya que precisa de suero u orina, muestras fácilmente disponibles.

Recientes avances tecnológicos basados en la cromatografía líquida de alta resolución acoplada con espectrometría de masas (UPLC-MS) han proporcionado a los investigadores la capacidad de medir cientos o incluso miles de metabolitos de molécula pequeña en tan sólo unos pocos minutos por muestra. **(156) (157)**

Se consigue analizar cualitativamente restos derivados de ácidos grasos en su forma original, tales como los lípidos séricos y una amplia gama de especies moleculares incluyendo también ácidos biliares, ácidos grasos no esterificados, y aminoácidos. Las técnicas son particularmente útiles para perfilar la diversidad molecular como, por ejemplo, ether- / acil glicerofosfolípidos, o las diversas subclases de esfingolípidos.

El rol de estos elementos específicos de la lipidómica, que no pueden ser identificados de manera eficiente mediante la metodología de análisis tras hidrólisis de lípidos/ácidos grasos, es importante en el contexto de los actuales modelos de lipotoxicidad, ya que se relacionan con la patogénesis del síndrome metabólico.

El escenario de la patogenia del NAFLD puede reflejarse en la metabolómica del suero de los pacientes. Niveles séricos elevados de AGNE pueden objetivarse en pacientes con esteatosis, evidenciándose la tendencia inversa en el NASH. Asimismo, en el NASH, la elevación de las acil-carnitinas indican disfunción de la β -oxidación mitocondrial, la alteración de los éter-fosfolípidos reflejan la perturbación de la función peroxisomal, y el aumento de los niveles de eicosanoides proinflamatorios proporcionan una prueba adicional de la actividad oxidativa extramitocondrial. La alteración de las vías enzimáticas que generan intermediarios lipotóxicos derivados de los AGNE o la inhibición de las vías de las que ellos disponen de ellos también puede promover lipotoxicidad. **(87) (158) (159)** Estudios de análisis selectivos de metabolitos ya han demostrado que las alteraciones del metabolismo hepático a través de las vías de la metionina o los fosfolípidos, están fuertemente asociados con el desarrollo de hígado graso no alcohólico. **(160) (161)** Cuando dichas alteraciones se reflejan en los perfiles metabólicos, pueden ser empleados como biomarcadores.

Se ha evidenciado una clara correlación entre los diferentes grados histológicos de NAFLD, el IMC y el perfil metabólico de los pacientes estudiados, identificándose 11 biomarcadores capaces de distinguir los pacientes con NASH de aquellos con esteatosis simple. Se ha alcanzado un área bajo la curva (ROC) de más de 0,90, alcanzando valores de 0.99 para la cohorte de pacientes con IMC menor de 30. **(162)** Discernir si los biomarcadores desempeñan un papel en la progresión de NAFLD o se deben a fenómenos secundarios, requiere una mayor investigación. **(163)**

Los grupos de metabolitos alterados en NAFLD respecto a sujetos sanos incluyen ácidos orgánicos, ácidos grasos libres, la fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, los ácidos biliares y esfingomielina. **(163)** Un incremento en la actividad $\Delta 6$ -desaturasa en ácidos grasos esenciales se ha asociado recientemente con la progresión de hígado graso no alcohólico. **(164)** El ácido araquidónico, se observa en mayores cantidades en las muestras NAFLD. El ácido araquidónico puede ser convertido en prostaglandinas, leucotrienos y lipoxinas. Las prostaglandinas y los leucotrienos son mediadores lipídicos proinflamatorios potentes. Los endocannabinoides también son metabolitos del

ácido araquidónico y han sido recientemente vinculados con el desarrollo de esteatosis. **(165)** La lipoxigenasa hepática (LOX) y sus metabolitos proinflamatorios de ácido araquidónico, también se han correlacionado con NASH. **(161)**

OWLIVER test está basado en investigación metabolómica a partir de un estudio multicéntrico con una cohorte de pacientes con biopsia hepática provenientes de 12 centros **(163)** **(166)** y, recientemente desarrollado, aporta información útil para diferenciar a los individuos que presentan esteatosis hepática no complicada de aquellos con esteatohepatitis.

Uno de los obstáculos que enfrenta la introducción de la tecnología metabolómica en la práctica clínica habitual es la necesidad del uso de complejos kits con técnicas hermanas a la transcriptómica o la proteómica. Como en cualquier nueva incorporación tecnológica al proceso diagnóstico se debe evaluar el coste y el beneficio en salud que supone comparado con la alternativa convencional basada exclusivamente en la biopsia hepática. **(167)**

1.1.5. HISTORIA NATURAL Y PRONÓSTICO

La mayoría de los estudios que analizan la historia natural de la NAFLD son retrospectivos y con un seguimiento a corto o medio plazo. La evolución clínica y la progresión histológica del NAFLD pueden ser muy variables. No existe ningún parámetro clínico o analítico que haya demostrado valor pronóstico de la progresión de esta enfermedad. En cualquier caso, son el grado y el estadio histológico de la enfermedad hepática los parámetros que mejor predicen el riesgo evolutivo y la mortalidad de NAFLD. **(168)** Por ello, la escala histopatológica que se utilice resulta de gran relevancia. El pronóstico puede enfocarse desde dos prismas: el del riesgo cardiovascular y el del riesgo de la progresión de la hepatopatía.

En los primeros años del conocimiento de esta entidad se comunicó que los pacientes con una esteatosis hepática simple tenían un curso clínico benigno, **(110)** **(169)** **(170)** con mínimas posibilidades de progresar histológicamente en un período de 15 años. Sin embargo, actualmente se conoce que hasta un 3% de estos pacientes pueden desarrollar cirrosis. **(110)** Por el contrario, los pacientes con otras formas histológicas más agresivas, como la esteatohepatitis, presentan un claro potencial hacia la progresión histológica, estimándose que en los casos con lesión hepatocelular o fibrosis, la evolución a cirrosis en un plazo de 10 años es relevante (21 y 26%, respectivamente), **(110)** **(171)** influyendo con ello en las tasas de supervivencia. **(110)**

Una vez establecida la cirrosis, el 30-40% de los pacientes fallecerán en un período de 1 año, **(110)** siendo la tasa de mortalidad similar **(172)** o incluso mayor **(173)** a la presentada por cirrosis asociada al virus de la hepatitis C.

En las cirrosis criptogénicas se observa una incidencia desproporcionadamente alta de factores de riesgo metabólico (diabetes mellitus tipo 2, obesidad, síndrome metabólico, etc.) y, por otra parte, sus biopsias muestran con frecuencia una o más características de NASH que se pierden cuando hay evolución a cirrosis. **(10)** **(174)** **(175)** **(176)**. A la vista de estos datos, hoy en día se acepta que hasta el 80% de las cirrosis criptogénicas son fases terminales de NASH.

Se describen cada vez más casos de carcinoma hepatocelular **(174)** **(10)** principalmente entre personas con fibrosis avanzada y cirrosis. **(177)** **(178)** **(179)** **(180)** **(181)** **(182)**

No se conoce con exactitud porque sólo un grupo de pacientes que padecen esteatosis evolucionan a formas más severas (NASH, fibrosis y cirrosis). Los factores de riesgo relacionados con el desarrollo de formas severas de la enfermedad parecen bien definidos en el adulto, y son la edad mayor a 45 años, sexo femenino, sobrepeso y diabetes mal controlada. **(183)** La obesidad y la diabetes no sólo intervienen en la etiopatogenia, sino que también influyen negativamente en el pronóstico, de forma que la obesidad disminuye la supervivencia e incrementa el riesgo de hepatocarcinoma tanto en la cirrosis criptogénica como en la cirrosis de otro origen; **(173)** y la diabetes aumenta el riesgo de producir formas más graves de NAFLD y de carcinoma hepatocelular en comparación con no diabéticos. **(184)** En la cohorte incluida en el estudio NAHNES III compuesta por 15866 pacientes, 2862 de los mismos presentaban una hepatopatía crónica, demostrándose que la DM tipo 2 y la RI eran predictores independientes de mortalidad global y de mortalidad relacionada con la enfermedad hepática tanto en pacientes con hepatopatía crónica grasa como en aquellos con hepatopatía crónica de etiología viral o alcohólica. **(185)**

Otro grupo de riesgo lo conforman los pacientes con obesidad mórbida que se someten a cirugía abdominal derivativa, como gastroplastia y derivación intestinal (yeyunoileal o yeyunocólica), ya que desarrollan NASH en el 20-40%. **(186)** Estos pacientes pueden evolucionar hacia una insuficiencia hepática aguda grave de curso fulminante en un 2-8% de los casos. **(185)**

Los resultados a largo plazo de los pacientes con NAFLD y NASH se han publicado en varios estudios, (187) (110) (170) (188) (189) (190) (191) (192) (193) resumiéndose en lo siguiente: A) los pacientes con NAFLD tienen un incremento en la mortalidad en comparación con las poblaciones de control, B) la causa más común de muerte en los pacientes con NAFLD y NASH es la enfermedad cardiovascular y C) los pacientes con NASH (pero no NAFLD) tienen un aumento de la tasa de mortalidad relacionada con enfermedad hepática. (194) En la **Tabla 5** se resumen los datos de varios estudios de seguimiento que describen la evolución natural de la enfermedad. (168) En un estudio realizado sobre una cohorte de 109 obesos daneses (170) con esteatosis simple, seguidos durante 17 años, encontraron que tan solo un paciente desarrolló cirrosis durante el seguimiento, siendo dicho paciente el único que falleció por causa hepática. Por el contrario, estudios realizados en pacientes con la enfermedad en estadio de cirrosis, presentaron un peor pronóstico. En esos estudios, el 9-26% de los pacientes murieron a los 4-10 años de seguimiento, siendo la enfermedad hepática la causa de la muerte de los pacientes. (173) (171) (195)

Tabla 5. Estudios publicados sobre el pronóstico de NAFLD.

1 NAFLD incluye a los pacientes con esteatosis simple y con esteatohepatitis no alcohólica;

2 La prevalencia de esteatosis incluye a aquellos pacientes que la presentan desde el inicio del estudio así como la desarrollada durante el seguimiento.

Autor, año	Diagnóstico ¹	n	Prevalencia Cirrosis% ²	Mortalidad por causa hepática n/%	Mortalidad Total n/%
Teli (169) 1995	Esteatosis	40	0	0	14/35
Dam-Larsen (170) 2004	Esteatosis	109	1	1/0.9	27/24.8
Matteoni (110) 1999	NAFLD	98	20	9/9	48/49
Adams (187) 2005	NAFLD	420	5	7/1.7	53/12.6
Ekstedt (188) 2006	NAFLD	129	7.8	2/1.6	26/20.2
Powell (171) 1990	NASH	42	7	1/2	2/5
Hui (172) 2003	Cirrosis	23	100	5/21	6/26
Hashimoto (195) 2005	NASH+fibrosis septal o cirrosis	89	48	6/6.7	8/9

Varios estudios y revisiones sistemáticas establecen un **mayor índice de marcadores de riesgo cardiovascular subclínicos** (como el engrosamiento medio intimal carotídeo) en pacientes afectados de NAFLD (186) respecto a grupos control. Muchos otros estudios

han establecido una mayor prevalencia de coronariopatía, enfermedad cerebrovascular o vasculopatía periférica en los pacientes afectados de NAFLD frente a controles. En todos aquellos estudios, tanto retrospectivos como prospectivos, en los que la biopsia es el método diagnóstico de NAFLD, se hace hincapié en el enorme riesgo y vigilancia que debiera hacerse en pacientes con NAFLD (esteatohepatitis o cirrosis) con respecto a la enfermedad cardiovascular, ya que ésta es una de las principales causas de muerte en este grupo de pacientes. No obstante, ha de tenerse en cuenta que la mayoría de estos estudios realizan análisis retrospectivos de la historia natural sobre pacientes con diagnóstico histológico de NAFLD, cometiendo un importante sesgo de selección al incluir pacientes procedentes de centros de tercer nivel donde presumiblemente se tratan las enfermedades más graves. **(185)**

NAFLD y, fundamentalmente, NASH se pueden considerar una enfermedad inflamatoria sistémica de bajo grado. Del mismo modo, la aterosclerosis también se considera una enfermedad inflamatoria de bajo grado; compartiendo, una y otra, múltiples mecanismos patogénicos. Varios estudios prospectivos que analizan la asociación entre NAFLD y la incidencia de eventos cardiovasculares mayores han demostrado un claro incremento del riesgo de eventos cardiovasculares tanto mortales como no mortales en pacientes con NAFLD, independientemente de otros factores de riesgo vascular clásicos como edad, sexo, perímetro abdominal, HTA, etc. **(196) (197) (198) (14)**

La disfunción endotelial es un paso inicial del desarrollo de la aterosclerosis; ésta puede definirse como una capacidad deteriorada de la arteria para dilatarse en respuesta a estímulos físicos y químicos, debido a la reducción de la liberación o a la mayor degradación del óxido nítrico (ON). La disfunción endotelial puede determinarse con facilidad de modo no invasivo valorando la vasodilatación mediada por flujo después de la oclusión de la arteria braquial, usando ecografía de alta resolución. En NAFLD se ha descrito una disminución de la reactividad de la arteria braquial mediada por flujo, más llamativa en los pacientes con NASH; **(199)** un incremento del espesor de la íntima-media carotídea directamente proporcional al estadio de la NASH e independiente de los factores de riesgo vascular clásicos, **(200)** un incremento del número de placas tanto calcificadas como no calcificadas en las coronarias **(201) (202) (203)** y/o una disminución diastólica en pacientes con HTA en relación con la severidad de la NASH. Además, se ha documentado una elevación de la concentración plasmática

de algunos factores proinflamatorios y proaterogénicos como la PCR ultrasensible, el PAI 1 y el fibrinógeno o una disminución de adipocinas antiinflamatorias como la adiponectina. **(186)** Estos últimos resultados están ajustados en función de la grasa visceral, lo cual parece indicar que la enfermedad hepática desempeña un factor aterogénico independiente.

Por último, la presencia de NAFLD en otras enfermedades hepáticas como la hepatopatía crónica por VHC, la producida por alcohol y la hemocromatosis, incrementa la severidad y progresión de la enfermedad. **(22)**

1.1.6. TRATAMIENTO

Las estrategias terapéuticas frente a esta enfermedad, debido a la estrecha relación patogénica existente entre NAFLD, el síndrome metabólico y la resistencia a la insulina, van encaminadas a identificar dichos factores de riesgo (sobrepeso u obesidad, diabetes, hiperlipemia, hipertensión y/o hiperuricemia) y efectuar un adecuado tratamiento de estas enfermedades asociadas. **(204)**

Como los pacientes con NAFLD sin esteatohepatitis tienen excelente pronóstico desde un punto de vista hepático, los tratamientos dirigidos a la mejora de la enfermedad hepática se deben limitar a las personas con NASH. En el momento actual no hay ningún tratamiento reconocido para NASH, siendo el único tratamiento que está consensuado el basado en los cambios higiénico-dietéticos. Un reciente metaanálisis **(205)** recoge los principales estudios sobre el tratamiento de NASH.

1.2. SÍNDROME METABÓLICO

1.2.1. DEFINICIÓN Y CRITERIOS DIAGNÓSTICOS

El síndrome metabólico (SM) es una entidad reconocida hace más de 80 años en la literatura médica, que con el paso del tiempo ha recibido distintas denominaciones. Las primeras descripciones de la asociación entre diversas situaciones clínicas como diabetes mellitus (DM), hipertensión arterial (HTA) y dislipemia datan de los años veinte del pasado siglo. Sin embargo, sus orígenes como síndrome surgen en 1988 cuando Reaven **(206)** observó que algunas entidades clínicas tales como las mencionadas DM, HTA y dislipidemia tendían a asociarse en un mismo sujeto, denominándolo “Síndrome X” y en cuya génesis la resistencia insulínica desempeñaría un papel clave. Posteriormente la Organización Mundial de la Salud (OMS) propuso la denominación de SM, que podría definirse como una asociación de problemas de salud causados por factores genéticos y ambientales que pueden aparecer de forma simultánea o secuencial en un mismo individuo, y que tienen como componente patogénico fundamental la resistencia a la insulina. **(207)** También, se define como la asociación de varios factores de riesgo clásicos y no clásicos de enfermedad cardiovascular (ECV) con una dieta hipercalórica rica en grasa, inactividad física y obesidad abdominal, **(78)** constituyendo una situación de riesgo elevada tanto de morbilidad como de mortalidad por ECV, **(208)** así como un factor de riesgo independiente tanto de ECV como de diabetes tipo 2.

La RI es un factor patogénico fundamental del SM, pero ambos conceptos (SM y RI) son intercambiables, siendo uno de los problemas fundamentales la ausencia de criterios diagnósticos uniformes. En este sentido, en 1998, la OMS estableció como criterio fundamental para definir SM la presencia de DM, intolerancia a la glucosa, alteración de la glucemia en ayunas o, en el caso de tolerancia normal a la glucemia, demostrar la existencia de RI. Además de este criterio fundamental el paciente debía presentar como mínimo, otros 2 criterios. Por otro lado, en 2001, el *National Cholesterol Education Program adult Treatment Panel III* (NCEP-ATP III) estableció unos criterios fácilmente aplicables a la práctica clínica habitual al no requerir demostrar la RI, si bien se utiliza como marcador indirecto de la misma una hiperglucemia mantenida. En 2005, la *International Diabetes Federation* (IDF) estableció como criterio fundamental para diagnosticar síndrome metabólico la obesidad

central, (209) (Tabla 6) ya que la distribución visceral o abdominal de la grasa corporal (perímetro de la cintura) es un factor que se correlaciona mejor con el riesgo de cardiopatía isquémica que la masa adiposa total. La distribución de la grasa en el obeso está relacionada de forma independiente con la morbilidad cardiovascular. (210) (211)

Tabla 6. Criterios diagnósticos de síndrome metabólico

A) Criterios diagnósticos del SM según la OMS 1998	
Criterio fundamental: DM, intolerancia glucosa, alteración glucemia en ayunas o, si el individuo tiene una tolerancia normal a la glucemia, resistencia a la insulina demostrada, más dos de los siguientes:	
1.	HTA en tratamiento o sin tratar > 160/90 mmHg.
2.	Dislipemia: TG > 150 mg/ dL, HDL < 35 mg/ dL en hombres ó < 40 en mujeres.
3.	Obesidad general (IMC > 30 kg/ m ²) o visceral (índice cintura abdominal/ cadera > 0,9 en varones o > 0,85 en mujeres).
4.	Microalbuminuria > 30 mg de albúmina/ g de creatinina.
B) Criterios diagnósticos de SM según el NCEP-ATP III (National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III). No existe criterio prioritario.	
1.	Obesidad abdominal (cintura abdominal > 102 cm en hombres o 88 cm en mujeres).
2.	Triglicéridos > 150 mg/ dL.
3.	HDL < 40 mg/ dL en hombres o 50 mg/ dL en mujeres.
4.	Tensión arterial > 130/ 85 mmHg.
5.	Glucosa basal > 110 mg/ dL
C) Criterios diagnósticos de la IDF (International Diabetes Federation) 2005.	
Criterio fundamental: Obesidad central, definida como cintura abdominal > 94 cm para varones y > 80 cm para mujeres de origen europeo, y además dos de cualquier otro de estos factores:	
1.	Triglicéridos elevados (de al menos 150 mg/ dL) o tratamiento específico para esta anomalía lipídica.
2.	HDL colesterol bajo (inferior a 40 mg/ dL en varones e inferior a 50 mg/ dL en mujeres), o tratamiento específico para esta anomalía lipídica.
3.	TA elevada: sistólica de al menos 130 mmHg, diastólica de al menos 85 mmHg o tratamiento antihipertensivo en pacientes previamente diagnosticados.
4.	Glucemia plasmática en ayunas elevada (de al menos 100 mg/ dL) o diabetes mellitus tipo 2 previamente diagnosticada.

1.2.2. EPIDEMIOLOGÍA

La existencia de tres posibles definiciones, que difieren únicamente en pequeños detalles, impide determinar la prevalencia global exacta del SM en el mundo, así como en países concretos, géneros y etnias. Esta ambigüedad en la definición conlleva obtener datos muy dispares. Kaur et al. (212) informaron que la prevalencia mundial del SM se ubica entre el 10 y el 84%, dependiendo del origen étnico, edad, sexo y raza de la población, mientras que el ejército israelí estima que una cuarta parte de la población

mundial tiene SM. Según el estudio de Pal y Ellis, **(213)** el 20% de los adultos de Occidente tienen síndrome metabólico.

Una serie de estudios revisados **(Tabla 7)** para Australia, China, Dinamarca, India, Irlanda y Estados Unidos confirman que el SM es un problema mundial grave.

Tabla 7. Prevalencia de SM en una selección de países según edad y definiciones de NCEP-ATPIII o IDF.
N/R, no registrado

País	n	Edad (años)	NCEP-ATPIII	IDF
Australia (214)	11247	≥25	24.4% hombre 19.9% mujer	34.4% hombre 27.4% mujer
China (215)	15540	35-74	9.8% hombre 17.8% mujer	N/R N/R
Dinamarca (216)	2493	41-72	18.6% hombre 14.3% mujer	23.8% hombre 17.5% mujer
India (217)	2350	>20	17.1% hombre 19.4% mujer	N/R N/R
Irlanda (218)	890	50-69	21.8% hombre 21.5% mujer	N/R N/R
EEUU (220)	3601	≥20	33.7% hombre 35.4% mujer	39.9% hombre 38.1% mujer

Independientemente de los detalles de cada definición, es generalmente aceptado por todos grupos que la prevalencia del SM está aumentando, de conformidad con el aumento del IMC y la edad. **(221)**

Con el fin de determinar la prevalencia de SM según grupos de edad, raza y género, un estudio estadounidense utilizó datos de la cohorte NHANES 2003-2006 de un total de 3.423 adultos. Los sujetos fueron clasificados en tres cohortes de edad, es decir, edad 20-39, 40-59 y > 60 años. La prevalencia global de SM fue del 34% en función del NCEP-ATPIII. Entre el grupo de edad 20-39 años, el 20% de los varones y el 16% de las mujeres tenían SM. Para los 40-59 años el 41% de los varones y el 37% de las mujeres tenían SM, y para el grupo de edad > 60 años, el 52% de los varones y el 54% de las mujeres tenían SM. Estos resultados muestran que la prevalencia del SM

aumenta con la edad, pero sin diferencia significativa entre géneros. Sin embargo, cuando la cohorte se dividió según la raza y el origen étnico, es decir, no hispanos blancos, no hispanos caucásicos y no hispanos afroamericanos, la diferencia en la prevalencia del síndrome metabólico fue evidente. En concreto, el 25% de los hombres negros no hispanos tenían SM, en comparación con el 37% de los hombres blancos no hispanos. Las mujeres no hispanas afroamericanas y las mujeres mexicano-estadounidenses presentaron aproximadamente 1,5 veces más probabilidades de tener SM que las mujeres blancas no hispanas. (221)

1.2.3. ETIOPATOGENIA Y FISIOPATOLOGÍA

La patogenia del SM no se conoce con exactitud, pero puede considerarse que la resistencia a la insulina representa el nexo entre sus diferentes manifestaciones, y la causa de la mayor parte de las anomalías presentes en él. La adiposidad abdominal y la insulinoresistencia son los dos mecanismos más destacables del SM. (222) Este síndrome se exacerba con la edad, factores genéticos, y un estilo de vida inapropiado que incluye inactividad física, consumo de alimentos hipercalóricos y de alto contenido en carbohidratos, y sal.

1.2.3.1. Obesidad

El exceso de peso corporal es sin duda un problema sanitario de primer orden por su prevalencia a nivel global y por considerarse un factor fundamental en el desarrollo de enfermedades metabólicas altamente prevalentes (diabetes mellitus, hipertensión arterial o dislipemia), cardiovasculares y del aparato locomotor. También hay que resaltar el efecto negativo producido en otras muchas patologías médico-quirúrgicas que condicionan una mayor complejidad y mayores costes sanitarios. (223)

La obesidad de forma genérica hace referencia a un exceso de masa grasa en el organismo. En la práctica se utiliza el índice de masa corporal para determinar la presencia de obesidad en un paciente; este índice relaciona el peso corporal (P) expresado en kilogramos con la talla (T) expresada en metros al cuadrado:

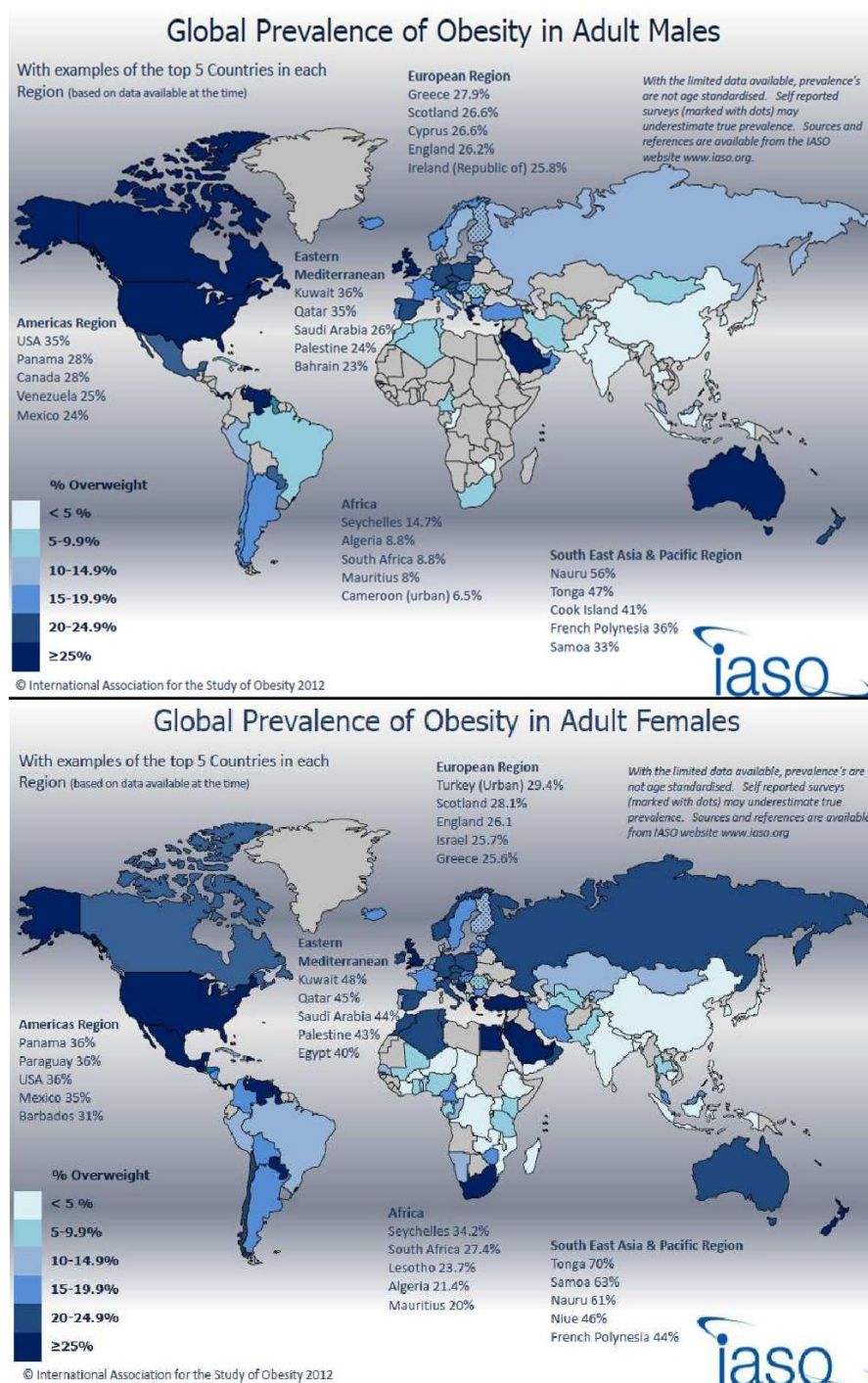
$$\text{IMC} = \text{P (kg)}/\text{T}^2 (\text{m}^2)$$

La característica real que define esencialmente a la obesidad es el exceso de grasa corporal por encima del rango de normalidad, siendo ésta del 12-20% del peso corporal en los hombres y del 20-30% en las mujeres. (224)

El IMC es el método más extendido en la práctica clínica por su facilidad de uso, reproductibilidad y por su capacidad de reflejar la adiposidad en la mayoría de la población. Se ha establecido en el ámbito internacional para adultos de 25-60 años la definición de obesidad como la presencia de un IMC igual o mayor a 30 kg/m², tanto en hombres como en mujeres. En personas mayores de 60 años se utiliza el mismo criterio que en los adultos, lo cual puede presentar algunas limitaciones en edades avanzadas donde se produce una importante disminución de la talla. En niños y jóvenes (2-24 años), el IMC se compara con el de la población correspondiente en edad y sexo; empleando las tablas de percentiles nacionales e internacionales.

La obesidad es una de las enfermedades metabólicas más prevalentes en las sociedades occidentalizadas. En la segunda mitad del siglo XX se produjo un importante aumento de la prevalencia de obesidad en la mayor parte de países (entre un 10-40%), tendencia que parece haberse frenado en los últimos años sin que se conozcan los motivos de una forma clara. A nivel mundial los datos de prevalencia recogidos por la OMS en 2008 refieren un 35% de adultos con sobrepeso, con un 10% de prevalencia de obesidad en varones y hasta de un 14% en mujeres. **(225)** Estas tasas son más altas en regiones como Hispanoamérica donde alcanzan hasta un 62% de sobrepeso y un 26% de obesidad, frente a otras áreas del sudeste de Asia que mantienen unos datos de prevalencia muy bajos de 14% de sobrepeso y 3% obesidad. La situación en Europa es intermedia con un claro gradiente norte-sur entre países. También existen datos de la Asociación Internacional para el Estudio de la Obesidad (IASO) que muestran las tendencias, mapas de prevalencia y distribución global de la obesidad. **(Figura 9).**

Figura 9. Prevalencia global y tendencias de obesidad y sobrepeso: datos IASO



FUENTE : International Association for the Study of Obesity 2012

http://www.iaso.org/site_media/library/resource_images/Global_Obesity_Top_5_in_each_region.df

En España los datos de prevalencia más recientes en adultos, surgidos del estudio ENRICA en 2011, aportan una prevalencia de obesidad del 22,9% y de sobrepeso del 39,4% sobre una población de 12.036 personas encuestadas. **(226)**

Se pueden establecer diversas clasificaciones de la obesidad según si los criterios que se utilicen están relacionados con la cantidad de grasa, su localización preferente, las causas o las características clínicas de la misma. **(Tabla 8).**

Tabla 8. Tipos de obesidad según diferentes criterios de clasificación

Criterio	Tipo de obesidad
Índice de masa corporal	<ul style="list-style-type: none"> Tipo I Tipo II Tipo III (mórbida) Tipo IV (extrema)
Distribución corporal de la grasa	<ul style="list-style-type: none"> Superior o androide Inferior o ginoide
Etiología	<ul style="list-style-type: none"> Primaria o esencial Secundaria por: <ul style="list-style-type: none"> Alteraciones hormonales Genopatías Medicamentos Cambio de hábitos
Morbilidad asociada	<ul style="list-style-type: none"> Simple Complicada

Según el valor de IMC, podemos clasificar a los sujetos en normopeso (18,5-24,9 kg/m²), obesidad (≥ 30 kg/m²) o sobrepeso (25 y 29,9 kg/m²), entendiendo que este amplio margen del aumento relativo del contenido de grasa es una situación de riesgo para la obesidad. No existe un criterio uniforme para delimitar los intervalos de

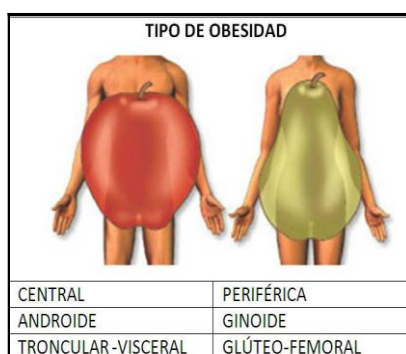
Tabla 9. Clasificación de la SEEDO del sobrepeso y la obesidad según el IMC.

Grado de sobrepeso u obesidad	Valores límite del IMC (kg/m ²)
Peso insuficiente	<18.5
Normopeso	18.5-24.9
Sobrepeso de grado I	25-26.9
Sobrepeso de grado II (pre-obesidad)	27-29.9
Obesidad de tipo I	30-34.9
Obesidad de tipo II	35-39.9
Obesidad de tipo III o mórbida	40-49.9
Obesidad de tipo IV o extrema	≥ 50

obesidad según los valores del IMC, y las clasificaciones pueden diferir ligeramente según la fuente consultada. En nuestro caso, seguiremos la establecida en el consenso de la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO). **(227) (Tabla 9).**

Puesto que la obesidad en realidad es un problema de exceso de grasa, el patrón de distribución de la grasa tiene gran importancia clínica por su relación con el riesgo cardiovascular y metabólico. Según la localización preferente de la adiposidad, se pueden distinguir dos tipos de obesidad. **(Figura 10).**

Figura 10. Patrón de distribución de grasa corporal



Un fenotipo sería el de la obesidad de distribución superior, central, abdominal, visceral o androide. En esta la grasa se acumula preferentemente en la mitad superior del cuerpo, en cara, cuello, tronco y región supraumbilical, localizándose especialmente en el interior de la cavidad abdominal, en mesenterio y en la periferia de las vísceras abdominales. Se denomina androide por ser la forma más común en los varones, aunque también se presenta en las mujeres. El otro tipo es la obesidad de distribución grasa inferior, periférica, glúteo-femoral o ginoide. La grasa se acumula preferentemente en la mitad inferior del cuerpo, localizándose en regiones infraumbilicales, caderas, glúteos, muslos y en situación superficial subcutánea. Es la forma más frecuente en mujeres, aunque también puede aparecer en los hombres. La obesidad glúteo-femoral suele presentar menor morbilidad y mortalidad.

En la actualidad, para estimar la acumulación central de grasa se utiliza fundamentalmente el perímetro de la cintura, que se correlaciona mejor con la grasa abdominal. Este parámetro se ha convertido en un elemento básico en la definición del síndrome metabólico, aunque el valor de referencia para determinar el riesgo cardiovascular difiere entre poblaciones. Para la población europea los valores que implican riesgo son ≥ 94 cm en hombres y ≥ 80 cm en mujeres. **(228)**

Desde el punto de vista etiológico, la obesidad es una enfermedad multifactorial y, en la mayoría de los casos, existe una predisposición genética junto a la concurrencia de factores desencadenantes ambientales. La obesidad primaria o esencial hace

referencia a la existencia de una alteración de los mecanismos fisiológicos reguladores del peso, sin que exista aparentemente ningún factor determinante. En cambio, en los cuadros de obesidad secundaria existe una relación causal entre otro proceso desencadenante y la obesidad, frecuentemente hormonal o farmacológico. Estos son una minoría en relación con los primeros. Las alteraciones hormonales más asociadas con la obesidad son el exceso de cortisol, propio del síndrome de Cushing, que desarrolla adiposidad central. También hay tendencia al aumento de peso en el hipotiroidismo, pues el déficit de hormona tiroidea dificulta la oxidación normal de la grasa del organismo. La hiperinsulinemia en la DM2 aumenta la síntesis y depósitos de grasa por la acción anabolizante de la insulina.

La obesidad de origen genético puede producirse por alteración de un solo gen responsable de algún mecanismo que regule los depósitos grasos del organismo, por ejemplo del gen de la leptina o su receptor. Lo más común es que sean poligénicas, pues hay más de cuatrocientos genes que intervienen en el control del metabolismo. Algunos de estos presentan obesidad dentro de un cuadro congénito complejo (síndromes de Prader-Willi, Alström o Bardet-Biedl).

Los fármacos que aumentan el apetito, como los antidepresivos tricíclicos y algunos antipsicóticos, u otros con acciones metabólicas que favorecen el depósito de grasa, como los glucocorticoides y los antidiabéticos inducen o empeoran cuadros de obesidad previa.

Según el criterio clínico de la existencia de comorbilidades asociadas se distinguen: obesidad simple, el individuo se encuentra subjetivamente bien y no se detectan alteraciones analíticas ni funcionales significativas; estos serían los obesos “metabólicamente sanos”. Por otro lado estaría la obesidad complicada con repercusión orgánica establecida, importantes cambios metabólicos y alteraciones analíticas.

El diagnóstico de estas complicaciones resulta imprescindible para el pronóstico y el adecuado tratamiento. En este sentido, debemos establecer riesgos y objetivos de tratamiento y por ello surge el sistema de estadiaje EOSS. (Edmonton obesity staging system). **(229)** El EOSS es un sistema de clasificación de la obesidad que tiene en cuenta la gravedad de las comorbilidades y el estado funcional dividiendo en diferentes estadios. Este sistema de estadificación debe utilizarse junto con los puntos de corte del IMC convencionales. Debemos planificar esfuerzos de prevención y detención de la

progresión de la obesidad en individuos con estadios 0 y 1 y reservar otros tratamientos para estadios más avanzados con criterios coste-efectividad. (**Tabla 10**).

Tabla 10. Sistema de estadiaje EOSS. (Edmonton Obesity Staging System)

ESTADIO 0:
El paciente no tiene factores de riesgo aparentes relacionados con la obesidad (por ejemplo, tensión arterial, lípidos séricos, glucosa en ayunas, etc dentro del rango normal), sin síntomas físicos, sin psicopatología, sin limitaciones funcionales y/o deterioro del bienestar.
ESTADIO 1:
El paciente tiene obesidad relacionada con los factores de riesgo subclínicos (por ejemplo, hipertensión borderline, glucosa en ayunas alterada, aumento de las enzimas hepáticas, etc), leves síntomas físicos (por ejemplo, disnea de esfuerzo moderado, dolores ocasionales, fatiga, etc), leve psicopatología, leves limitaciones funcionales y/o deterioro leve del bienestar.
ESTADIO 2:
El paciente presenta enfermedades crónicas establecidas relacionadas con la obesidad (por ejemplo, hipertensión, DM2, apnea del sueño, osteoartritis, enfermedad por reflujo, síndrome de ovario poliquístico, trastorno de ansiedad, etc.), limitaciones moderadas en las actividades de la vida diaria y/o bienestar.
ESTADIO 3:
Los pacientes presentan daños definitivos en los órganos tales como infarto de miocardio, Insuficiencia cardíaca, complicaciones de la diabetes, artrosis incapacitante, limitación significativa psicopatológica, funcional y/o deterioro del bienestar.
ESTADIO 4:
El paciente tiene graves discapacidades, potencialmente en etapa terminal, por las Enfermedades relacionadas con la obesidad, psicopatología crónica grave incapacitante, limitación funcional severa y/o deterioro grave del bienestar.

El elemento de confluencia final en el esquema fisiopatológico de la obesidad es la alteración del balance entre la ingesta y el gasto energético, aunque los mecanismos que llevan a este punto no se conocen con exactitud en el momento actual.

Se han establecido una serie de señales orexígenas/anorexígenas que mantienen en equilibrio la regulación del apetito a nivel central. Así el hipotálamo, en diferentes centros específicos, sería el encargado de recibir estas señales de leptina, neuropéptido Y (NPY), insulina, glucagón, hormona liberadora de corticotropina (CRH), hormona estimuladora de los melanocitos (MSH), triptófano, dopamina, adrenalina, serotonina, noradrenalina, colecistocinina, peptido YY, neurotensina, endorfinas, encefalinas, etc.

También diferentes áreas del tubo digestivo y órganos próximos, como páncreas, hígado, y el tejido adiposo distribuido por todo el organismo cierran el triángulo regulador de la ingesta. Algunas de las principales sustancias reguladoras de la ingesta son leptina, neuropéptido Y y Ghrelina.

Por otra parte, los condicionantes sociales de la ingesta: tipo, horario de comidas, características organolépticas de los alimentos, tamaño de ración, duración de ingesta, etc., tienden a debilitar los factores fisiológicos reguladores de la misma.

Aunque el aumento en la ingesta calórica es un factor fundamental en la obesidad, también la alteración del gasto energético total o en alguno de sus componentes podría contribuir a facilitar la acumulación de grasa en el tejido adiposo.

El metabolismo basal (gasto energético basal = GEB) representa el gasto de energía necesario para el mantenimiento de los procesos vitales y es el principal componente del gasto energético en condiciones normales, ya que representa en torno al 70% del gasto total. El GEB, el efecto térmico de los alimentos, la termogénesis inducida por el frío y el efecto térmico del ejercicio físico son componentes que en algunos casos como el asociado a la actividad física es ampliamente variable entre individuos.

La mayor parte de los estudios demuestran que el gasto energético frente a una actividad física particular es superior en obesos que en delgados, debido a que tienen que realizar un mayor esfuerzo para desplazar un mayor peso corporal.

El músculo esquelético se ha identificado como un órgano secretor de citoquinas y otros péptidos que se producen, expresan y liberan por las fibras musculares y que ejercen tanto efectos autocrinos o paracrinos como endocrinos. **(230)** Estas miokinas ayudan a los músculos a comunicarse con otros órganos, tales como el tejido adiposo, hígado, páncreas, huesos y cerebro. Muchas proteínas producidas por el músculo esquelético dependen de la contracción, por lo tanto, la inactividad física probablemente conduce a una respuesta alterada de estas miokinas, lo que podría proporcionar un mecanismo potencial para la asociación entre el comportamiento sedentario y muchas enfermedades crónicas. **(231)** Sabemos que el ejercicio es capaz de inducir un balance energético negativo no sólo por su coste directo de actividad física, sino también por sus efectos sobre el metabolismo basal.

1.2.3.2. Resistencia a la insulina y/o Diabetes Mellitus tipo 2

La resistencia a la insulina se caracteriza por una disminución en la capacidad de la insulina para estimular la utilización de la glucosa por los tejidos, y para suprimir la producción y liberación de glucosa hepática. Además, implica una resistencia a la acción de la insulina en el metabolismo de proteínas y lípidos, en la función endotelial vascular y en la expresión de múltiples genes.

En los estadios iniciales del SM la tolerancia a la glucosa es normal a pesar de la resistencia a la insulina, debido a la función compensadora de las células β . Con el tiempo, en personas predispuestas, se produce un progresivo fallo en la secreción de insulina, mostrándose la función de la masa beta insuficiente para ejercer la función compensadora hiperinsulinémica y apareciendo, primero, la intolerancia glucídica (IG) y, posteriormente, el aumento mantenido de producción hepática de glucosa y diabetes. **(232)**

En caso contrario, si la hiperinsulinemia se sostiene, se desarrollan una serie de alteraciones, principalmente de tipo metabólico, que aumentan el riesgo de sufrir ECV. **(233)** Como consecuencia de la acción mitogénica de la insulina se producen cambios en la proliferación de las células del músculo liso vascular, que se hipertrofian y crecen dando lugar a una disfunción endotelial. Se ha comprobado una gran similitud entre la proinsulina, la propia insulina, y los péptidos conocidos como factores de crecimiento, con propiedades semejantes a la insulina tipo 1 y 2 (IGF-1 e IGF-2) que son estimuladores del crecimiento endotelial. **(234)** La hiperglucemia aumenta la producción de radicales libres en las células endoteliales, e induce un aumento en la formación de productos avanzados de glucosilación. Se produce un considerable aumento del ión superóxido en las células endoteliales, y aumenta la producción de nitrotirosina (un marcador de estrés oxidativo que puede además inducir apoptosis en las células miocárdicas). Se anula, en último término, la vasodilatación dependiente de endotelio en las grandes arterias, probablemente por incremento del estrés oxidativo. **(235)** La microalbuminuria aparece en el contexto del SM como manifestación de la disfunción endotelial temprana. **(236)**

El riesgo de aparición de diabetes mellitus tipo 2 es heterogéneo entre los individuos obesos. **(237)** Existen pacientes con un cuadro de obesidad importante, incluso extrema, y una situación metabólica normal (obeso metabólicamente sano) lo que expresa la existencia de diversos fenotipos con variables grados de resistencia insulínica. La idea de la obesidad metabólicamente sana no es nueva, pero no existen criterios estándares claros para definirla y los mecanismos biológicos son en gran parte desconocidos por lo que aún no se ha estandarizado su paso a la difusión clínica. Sin embargo, esta idea pone de relieve la necesidad de considerar otros parámetros metabólicos y antropométricos, además del IMC. **(238)**

1.2.3.3. Hipertensión arterial

La HTA es también un componente central en el SM, de manera que aproximadamente el 85% de los pacientes con SM sufren esta condición. **(239)**

La obesidad es un factor de riesgo independiente e importante de hipertensión. La prevalencia de hipertensión en pacientes obesos es del 25 al 50%, mucho más elevada (x 5) que en la población general. Una elevación de un 1 mmHg de la presión arterial sistólica ajustada por la edad en una población adulta, viene asociada a un aumento del perímetro cintura de 2,5 cm y 4,5 cm y un incremento del IMC de 1,25 kg/m² en hombres y 1,7 kg/m² en mujeres respectivamente. El 79% del riesgo de hipertensión en varones y el 65% en mujeres se consideran secundarios al exceso de peso (Estudio de Framingham). Existe una correlación fuerte entre el grado de exceso de peso y su distribución con el riesgo de hipertensión de forma reversible a medida que se produce una pérdida de peso modesta (5-10% del peso corporal), sobre todo cuando se mantiene a largo plazo, reduciéndose sustancialmente el riesgo de hipertensión en adultos con sobrepeso. **(240)**

Los mecanismos fisiopatológicos que subyacen en la elevación de la presión arterial en sujetos obesos son múltiples y complejos. Quizás el hiperinsulinismo y la resistencia a la insulina se han postulado con mayor interés, ya que la intervención en peso con dieta o ejercicio en sujetos obesos produce un descenso significativo de la insulina que se correlaciona con el descenso de la presión arterial.

Además de la hipertrofia del músculo liso y la disfunción endotelial, se señalan como mecanismos implicados en la HTA del paciente con SM otros mecanismos como es el incremento de la actividad del sistema nervioso simpático estimulado por el tejido adiposo visceral, cambios en el sistema renina-angiotensinaaldosterona (SRAA), con una mayor actividad de otros mineralocorticoides, ingesta excesiva de sodio y cloruro y la enfermedad renal que puede reducir la tasa de filtración glomerular. **(241)** Los pacientes con obesidad y riesgo cardiometabólico asocian frecuentemente, aunque existe un importante infradiagnóstico, algún grado de prehipertensión o hipertensión de grado 1 no conocidas. **(242)**

1.2.3.4. Dislipemia

Se considera que la dislipidemia asociada con el SM es altamente aterogénica **(243)** y se caracteriza por:

- *Hipertrigliceridemia*: Triglicéridos (TG) >150 mg/dl

- *Colesterol HDL* disminuido:
 - a. Hombres: HDL <40 mg/dl
 - b. Mujeres: HDL <50 mg/dl
- Aumento de lipoproteínas de baja densidad (*LDL*) pequeñas y densas.
- Aumento de *ácidos grasos libres* en plasma.
- Aumento de *apolipoproteína B*.

El HDL bajo y los triglicéridos elevados son predictores independientes de riesgo cardiovascular en pacientes con SM. (244) Asimismo, la combinación de HDL bajo y glucemia basal elevada ha demostrado ser predictor de enfermedad coronaria.

El aumento en el riesgo cardiovascular que se observa en la obesidad, sobre todo en la de distribución troncular, puede depender en gran medida de la presencia de este perfil lipídico “aterogénico”. (245)

1.2.4. DIAGNÓSTICO

1.2.4.1. Clínica

Puesto que los síntomas que se manifiestan con el síndrome metabólico son escasos, la identificación de los sujetos se llevará a cabo según la existencia de factores de riesgo. Los factores de riesgo más estrechamente asociados con el síndrome metabólico incluyen:

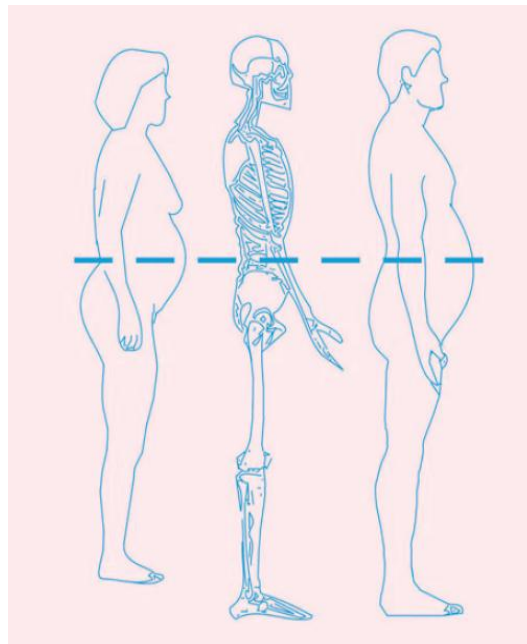
- *Edad*: la incidencia del síndrome metabólico aumenta con la edad.
- *Origen étnico*: Las mujeres no hispanas afroamericanas y las mujeres mexicano-estadounidenses presentaron aproximadamente 1,5 veces más probabilidades de tener SM que las mujeres blancas no hispanas. (221)
- *IMC* superior a 25.
- *Antecedentes personales de diabetes gestacional*.
- *Estado posmenopáusico*.
- *Dietas ricas en grasas*.
- *Estilo de vida sedentario*.

1.2.4.2. Antropometría

El protagonismo de la **cintura** como expresión de la obesidad central es cada vez mayor dada su relevancia y facilidad de translación al terreno clínico como medida de intervención y predicción del riesgo. En un metaanálisis de 258.000 sujetos, cada incremento de 1 cm del perímetro de la cintura se asoció con un aumento del 2% de riesgo de eventos cardiovasculares, tanto en varones como en mujeres. **(246)**

Para su correcta medida, el paciente está en bipedestación, el examinador se coloca a su derecha y dibuja una marca justo encima del borde lateral superior de la cresta ilíaca derecha, justo en la línea medioaxilar. La cinta métrica se pone en un plano horizontal alrededor del abdomen, sobre esta marca, ajustándola cómodamente a la piel, pero sin comprimirla. La medición se hace durante la inspiración normal mínima. **(Figura 11)**

Figura 11. Referencias anatómicas para determinar la circunferencia de la cintura



El valor de referencia para determinar el riesgo cardiovascular difiere entre poblaciones. **(Tabla 11).**

Tabla 11. Umbrales específicos de la circunferencia de la cintura según origen étnico.

Etnia	Hombre	Mujer
Europeos	≥ 94 cm	≥ 80 cm
Sur asiáticos	≥ 90 cm	≥ 80 cm
Centro y Sur americanos	≥ 90 cm	≥ 80 cm
Oriente medio	≥ 94 cm	≥ 80 cm
Subsahariano	≥ 94 cm	≥ 80 cm
Chinos	≥ 90 cm	≥ 80 cm
Japoneses	≥ 90 cm	≥ 80 cm

La determinación del porcentaje de grasa y masa magra corporal aporta información clínica que no puede ser obtenida a partir de los parámetros antropométricos clásicos y que es relevante para realizar una correcta evaluación nutricional y una adecuada estratificación del riesgo metabólico-cardiovascular, así como para evaluar el efecto de las actividades preventivas (dieta, ejercicio) que se planifiquen. Ambos parámetros complementan la evaluación realizada a partir del **IMC** y de los estimadores de la distribución de la grasa corporal como el perímetro de la cintura y, junto con la evaluación de otros factores de riesgo asociados, pueden facilitar la toma de decisiones clínicas.

En la primera mitad de la década de los años 80 del siglo pasado comenzaron a publicarse estudios que analizaban el compartimento libre de grasa del organismo a partir de la estimación del compartimento acuoso, utilizando equipos de análisis por **impedancia bioeléctrica** (BIA) de cuatro electrodos colocados en las extremidades superior e inferior. (247) La BIA no realiza mediciones directas de los compartimentos corporales, sino que opera a partir de la medición de propiedades físicas que deben ser traducidas a valores que cuantifiquen un determinado compartimento corporal. Posteriormente, dicho valor será utilizado para contribuir a la valoración nutricional y al seguimiento evolutivo y terapéutico de los procesos fisiopatológicos del individuo. Por tanto, la estimación de estos compartimentos se realiza a partir de ciertos parámetros antropométricos y de funciones matemáticas específicamente implementadas para la población en la que se aplican, siendo esta metodología común a diversas modalidades de BIA monofrecuencia y multifrecuencia, cuya diferenciación se basa en la frecuencia a la que es suministrada la corriente por los diversos dispositivos. En el caso de los equipos monofrecuencia, la corriente penetra en el organismo a una frecuencia fija de

50 KHz, mientras que los equipos multifrecuencia operan con un rango de frecuencias fijas predeterminadas.

Para intentar mejorar la estimación de ciertos compartimentos corporales como la masa libre de grasa (MLG), y de los fluidos intra y extracelulares, se desarrollaron distintos modelos de BIA variando la posición de los electrodos, dando lugar al desarrollo del llamado BIA segmentario en sus diversas modalidades. El BIA segmentario se justifica por el concepto físico de que los diferentes segmentos corporales no contribuyen por igual a la resistencia corporal total. La metodología del BIA segmentario sirvió de base para el desarrollo de los equipos que utilizan electrodos situados en la planta de ambos pies y ambas manos, **(247)** método que se ha denominado BIA de arco inferior y superior, respectivamente. La modalidad de arco inferior permitió el acceso a sistemas de impedancia monofrecuencia como los primeros TBF 105® y TBF 305® de Tanita, que incorporan los electrodos en la zona de la planta de los pies, en forma de dos placas metálicas subdivididas para la zona del talón y la planta del pie. **(248)** El dispositivo es similar a una báscula de baño, donde se coloca al paciente como si se tratara de pesarlo. Este dispositivo va unido a una consola donde se introducen los datos antropométricos del paciente, posteriormente, en una pantalla y una impresora aparecen los datos relativos al análisis corporal total de masa grasa (MG) y MLG, porcentaje de MG y agua corporal total (ACT) **(Figura 12)**. Debido a que en esta modalidad de BIA la corriente circula solamente por los miembros inferiores y la parte inferior del tronco, las estimaciones totales de los compartimentos corporales se realizan mediante extrapolaciones realizadas por modelos matemáticos similares al BIA corporal total.

Este sistema de impedanciometría representó ciertas ventajas sobre el método tetrapolar clásico en cuanto a simplificación de la técnica de realización ya que no se requiere entrenamiento del operador en el posicionamiento de los electrodos, reduciendo el posible factor de variación interoperador, el peso del sujeto es medido directamente por el sistema facilitando la realización de la exploración en los casos de trabajos de campo con poblaciones amplias, elimina el período de espera necesario para la estabilización de los compartimentos hídricos al adoptar decúbito, **(249)** y en cuanto a material, no requiere el empleo de electrodos desechables. Diversos autores han realizado estudios de validación con este modelo de BIA, **(250)** **(251)** y evaluaciones frente al BIA tetrapolar clásico en posición supina, en sobrepeso y obesidad durante

tratamientos reductores de peso; (252) (253) sin embargo una crítica a los modelos de arco superior e inferior, al igual que para el modelo estándar de muñeca-tobillo, reside en las dudas sobre la adecuada representatividad del BIA corporal total.

Figura 12. Modelo BIA de arco inferior de Tanita®



El BIA segmentario continua su proceso de validación con técnicas de referencia y aunque existen ciertas inconsistencias metodológicas entre los estudios, debido por ejemplo a diferencias en la posición de los electrodos; sus principios teóricos pueden ser de aplicación en la valoración de los cambios de la masa muscular y distribución regional de la grasa en la sarcopenia y obesidad y durante el ejercicio físico, en el seguimiento de los tratamientos reductores de peso, y en las patologías que influyen en la distribución de los líquidos corporales, como ascitis, pacientes en diálisis, quemados, etc. (254)

Las aplicaciones clínicas fundamentales del BIA van dirigidas, por tanto, a estimar el compartimento de ACT y sus subcompartimentos agua extracelular (AEC) y agua intracelular (AIC) tanto en los estados fisiológicos como en las patologías que los alteran.

La estimación de la MLG permite, de forma secundaria, estimar el componente adiposo del organismo a partir del peso corporal del individuo. Sin embargo, la validez de la estimación de la MG requiere una estimación válida de la MLG, la cual depende, a su vez, de la estimación del ACT. En el caso del BIA monofrecuencia a 50 kHz no se realizan estimaciones del ACT, sino del AEC y las estimaciones del ACT se basan en la relación estable que mantienen AEC y ACT en los individuos sanos. (255) Estos valores

constituyen una herramienta adicional en el estudio de la composición corporal del paciente obeso, tanto en su valoración inicial, como en el seguimiento terapéutico.

La estimación de la masa celular corporal (MCC) como compartimento predominantemente proteico es fundamental en la valoración nutricional, ya que proporciona una referencia para determinar los requerimientos metabólicos en cuanto a necesidades calóricas. Por otro lado, la MCC se afecta en aquellas patologías que inducen un aumento del catabolismo, de tal modo que una disminución en la MCC se asocia con un peor pronóstico clínico. **(256)** La estimación del AIC es el parámetro que mejor determina la MCC por BIA, basado en la relación matemática $MCC = AIC / 0,70$.

En definitiva, el análisis de la composición corporal mediante BIA es un método ampliamente utilizado en diversos contextos fisiopatológicos debido a que su facilidad de manejo; su portabilidad, bajo coste, escaso riesgo y rapidez en las exploraciones incrementan su accesibilidad para realizar estudios poblacionales y exploraciones repetidas. Además, su reducida variabilidad interoperador y elevada correlación con técnicas de referencia ha supuesto su inclusión tanto en la valoración inicial como en el posterior seguimiento de estados patológicos que conllevan alteración de los compartimentos hídricos corporales y/o variaciones en los compartimentos graso y no graso del organismo.

1.2.4.3. Laboratorio

La **glucosa en ayunas** se determina tras un periodo de ayuno de 8 horas aproximadamente. Un valor menor a 100 mg/dl se considera como normal. Valores entre 100 y 126 mg/dl indican la existencia de intolerancia a la glucosa y un valor de 126mg/dl obtenido dos veces en el laboratorio se considera indicador de diabetes.

El valor de la **hemoglobina glicosilada (HbA1c)**, mide el porcentaje de hemoglobina unida a la glucosa y refleja el promedio de los niveles de glucosa en sangre durante los últimos 2 - 3 meses. **(Tabla 12) (257)** Se ha demostrado que la prueba de HbA1c es una herramienta útil para la evaluación del control glucémico.

Tabla 12. Correlación entre HbA1C y niveles séricos de glucosa

HbA1c%	Promedio de glucosa estimada (mg/dl)
5	97
6	126
7	154
8	183
9	212
10	240
11	269
12	298

Por otra parte, existen diferentes estrategias para la evaluación de la resistencia a la insulina, con técnicas analíticas de datos basales o tras estimulación, con estímulo oral o intravenoso. La validación de las diferentes técnicas se realiza de acuerdo a su comparación con el clamp euglucémico, que es el “Gold estándar” del estudio de la insulinresistencia. (Tabla 13). Comentaremos únicamente algunas determinaciones basales.

Tabla 13. Técnicas de evaluación analítica de insulinresistencia

Basados en datos basales
<ul style="list-style-type: none"> • Insulinemia basal • Cociente glicemia/insulinemia basal • Modelo homeostático-HOMA • Índice FIRI • Índice QUICKI • Índice ISI
Basados en estímulo oral (SOG)
<ul style="list-style-type: none"> • Insulinemia estimulada • Índice de Belfiore • Índice de Cederholm • Índice de Matsuda
Basados en estímulo intravenoso (Técnicas de clamp)
<ul style="list-style-type: none"> • C. Euglucémico hiperinsulinémico • C. Hiperglucémico

La *insulinemia basal*, por si misma o formando parte de índices que la utilizan en su cálculo, se correlaciona con las estimaciones de la resistencia a la insulina por métodos más complejos, como el clamp. Estas buenas correlaciones, junto con el resultado de estudios epidemiológicos amplios hacen que numerosos autores consideren la insulinemia basal como una razonable aproximación al grado de insulinresistencia

sobre todo en pacientes no diabéticos. Sus inconvenientes son también claros porque existe un considerable solapamiento entre los resultados en individuos normales e insulínresistentes, por lo que es un método poco útil en muestras pequeñas. En diabéticos, debido al defecto de secreción progresivo, no es un parámetro demasiado útil para diferenciar pacientes con insulínresistencia.

El **cociente glucemia/insulinemia basal** ha recibido numerosas críticas ya que mantiene los inconvenientes de la determinación de la insulinemia y a medida que aumenta la insulina de forma fisiológica también aumenta la glucemia basal lo que lleva a una correlación escasa con los resultados del clamp sin aportar nada sobre la insulinemia basal.

El **modelo homeostático-HOMA**, es un modelo matemático desarrollado a partir de datos conocidos en humanos en cuanto a la relación de interdependencia entre la glucemia y la insulinemia (homeostasis). Este modelo se basa en que cuando existe un déficit secretor de insulina, la insulinemia puede mantenerse cerca de lo normal a expensas de tener una glucemia basal elevada y viceversa, cuando existe resistencia a la insulina, la glucemia basal tiende a mantenerse cerca de lo normal gracias a una hiperinsulinemia compensadora. A partir de una muestra simultánea para glucosa e insulina plasmáticas (insulinemia (mU/mL) x glucemia (mmol/L) / 22,5) se puede estimar la resistencia a la insulina (HOMA-IR) y la capacidad secretora del individuo. (258)

Presenta buena correlación con la insulínresistencia global determinada por el clamp pero es un método con una variación intraindividual del 30% debido a la variabilidad de la secreción de insulina y a la influencia del estrés o el ejercicio. Además, refleja fundamentalmente la resistencia a nivel hepático, que es la que predomina en ayunas y no la muscular.

El **péptido C**, también llamado péptido conector, es una cadena de aminoácidos que conecta las cadenas A y B de la proinsulina y es metabólicamente inactivo.

Durante la conversión de proinsulina a insulina, el péptido C es escindido de las cadenas de la proinsulina, formándose la molécula de insulina.

El péptido C y la insulina son secretados a la circulación portal en concentraciones equimoleculares. En la circulación periférica el nivel de péptido C es mayor que el nivel de insulina debido a que su vida media es más larga.

Las concentraciones de péptido C son un mejor indicador del funcionamiento de las células beta que la concentración periférica de insulina.

Además, las determinaciones de péptido C no miden insulina exógena, razón por la cual el péptido C se mide para diferenciar la insulina producida por el cuerpo de la insulina inyectada en el organismo y no reacciona de manera cruzada con los anticuerpos anti-insulina, los cuales interfieren con los inmunoensayos para determinar insulina. **(259)**

Por último, y en relación con la dislipemia, puntualizar que si bien el nivel de **triglicéridos** y de **colesterol total**, **HDL** y **LDL**, se evalúan de rutina en la práctica clínica, las determinaciones de AGL y apolipoproteína B no suelen determinarse por no estar incluidas en los criterios de las diferentes organizaciones, si bien diversos estudios relatan su relación con el SM y la ECV.

1.2.5. TRATAMIENTO

En los pacientes con obesidad que presentan trastornos del metabolismo de la glucosa, la reducción de peso, el incremento de la actividad física, o ambos, serán el tratamiento de elección, al haberse demostrado que retrasan la evolución a diabetes. **(260)** Por otro lado, la pérdida de peso reduce o elimina las comorbilidades asociadas a la obesidad y disminuye el impacto de las futuras complicaciones médicas relacionadas con el exceso de peso.

El **tratamiento dietético de la obesidad** incluye todas aquellas medidas que, a través de la modificación del patrón alimentario del paciente, tratan de inducir un balance energético negativo que ayude a eliminar el exceso de masa grasa y por tanto a una pérdida de peso mantenida a largo plazo.

Existen unas recomendaciones sobre las características y reparto de nutrientes en las dietas hipocalóricas equilibradas, que están referenciadas en prácticamente todas las guías de práctica clínica sobre el manejo de la obesidad. El problema de los tratamientos dietéticos convencionales es la falta de adherencia que presentan estos tipos de dietas.

Las modificaciones individuales en los porcentajes de macronutrientes en función de las características del paciente pueden ser de gran utilidad en pacientes con diabetes o síndrome metabólico o en los que una reducción de carbohidratos a cambio de un incremento de grasa monoinsaturadas puede ayudar a mejorar el perfil de riesgo cardiovascular y una mayor adherencia a la dieta. **(261)**

La ***Dieta Mediterránea*** (DME) es probablemente uno de los modelos dietéticos más saludables que existen actualmente. (262) Numerosos estudios epidemiológicos (263) (264) (265) (266) ponen de relieve los efectos beneficiosos de este tipo de dieta frente a enfermedades cardiovasculares, diabetes, ciertos tumores y otras patologías asociadas con el estrés oxidativo.

En este sentido la DME se relaciona con una mayor expectativa de vida y una menor incidencia de enfermedades crónico-degenerativas, (267) (268) evidenciándose que un pequeño incremento en el índice de adhesión a esta DME conlleva una reducción significativa en el riesgo de mortalidad y en la incidencia de dichas enfermedades. (269)

La DME se caracteriza por un perfil alimentario moderado en el que adquieren protagonismo algunos grupos de alimentos típicos de la región mediterránea: cereales, legumbres, pescado, aceite de oliva, frutas, frutos secos, verduras, hortalizas y vino. Sin embargo, no solo representa ciertos hábitos alimentarios o nutricionales sino que hace referencia a un determinado estilo de vida, el cual se ha forjado a lo largo de siglos por las condiciones geográficas, climatológicas, orográficas, culturales y ambientales preponderantes en los países y regiones enmarcados en la cuenca del Mediterráneo. (270)

La adhesión a la DME, como modelo alimentario saludable, puede cuantificarse mediante diferentes índices en los que se puntúa positivamente los alimentos y nutrientes que contribuyen beneficiosamente a proteger y preservar la salud. (271) En nuestro caso nos basaremos en el cuestionario de adherencia a la DME de 14 ítems, (263) considerando una puntuación menor de siete puntos, baja adherencia a la DME y una puntuación por encima de 10, buena adherencia a la DME.

La evidencia científica señala una íntima asociación entre un estilo de vida sedentario con la aparición de SM. Las diferentes sociedades científicas recomiendan que un adulto debería realizar 30 o más minutos diarios de una ***actividad física*** de intensidad moderada, preferentemente todos los días de la semana, con la finalidad de mejorar la salud y prevenir las enfermedades cardiovasculares. El beneficio es mayor cuando la actividad física es mantenida en el tiempo. (272) Se conoce que un ejercicio de <150 min/semana solo promueve una mínima pérdida de peso. Una actividad física mayor se relaciona con una pérdida de peso modesta entre 2- 3 kg.

En la actualidad existen métodos directos e indirectos para medir la actividad física. Los métodos directos son usualmente sensores de movimiento tipo acelerómetros

que miden aceleración en el plano vertical, y podómetros los cuales censan los pasos que el paciente realiza en un ambiente totalmente natural. (273) Por su parte, los métodos indirectos miden la actividad física mediante el registro en cuadernos o cuestionarios. Los cuestionarios se basan en la autoaplicación de una serie de preguntas destinadas a evaluar la actividad física diaria, pudiendo ser aplicados en persona, por teléfono o incluso enviados por correo. (273)

Existen 3 tipos de cuestionarios: los globales, que evalúan el nivel de actividad física general y dan información sobre los tipos y patrones de actividad física; los recordatorios, que permiten evaluar la actividad física realizada hace días, semanas o un mes, lo cual permite conocer el tipo de actividad física predominante; y los cuantitativos, que miden la actividad física de varios meses, así como su duración e intensidad, por lo cual son claves para cuantificar el pronóstico del paciente. (273) Uno de los cuestionarios más utilizados es el **IPAQ** (siglas en inglés de International Physical Activity Questionnaire), desarrollado bajo la supervisión de la OMS en 1998 con el objetivo de crear una herramienta que permitiera estimar la actividad física en poblaciones entre 18-65 años de diferentes países. Existen 2 formas del cuestionario, el corto (IPAQ-SF) para estudios de vigilancia, y el largo (IPAQ-LF) destinado a obtener información referente a la duración e intensidad de la actividad física en el trabajo, el hogar, el transporte y en períodos de ocio. (274) (275)

Por último, enfatizar que el **tratamiento de la hipertensión arterial en la obesidad** con modificaciones del estilo de vida es fundamental. La pérdida de peso y el incremento de la actividad física deben realizarse en el entorno de una dieta saludable con una reducción en el consumo de sal a menos de 6 g de cloruro sódico al día, incremento del consumo de frutas y vegetales y descenso del consumo de productos ricos en grasas. De igual forma un aumento de los aportes de potasio (1,9 g/día) es eficaz en disminuir la presión arterial según las recomendaciones DASH (Dietary Approaches to Stop Hypertension).

El objetivo de control es 140/90 mmHg en pacientes sin diabetes mellitus o enfermedad renal crónica, siendo necesario reducir la presión arterial a valores por debajo de 130/80 mmHg en caso de su coexistencia. Se deberían iniciar cambios del estilo de vida cuando la presión arterial es de 120/80 mmHg, e iniciar tratamiento farmacológico cuando la presión arterial supera 140/90 mmHg.

1.3. MICROBIOTA INTESTINAL

1.3.1. DEFINICIÓN DE MICROBIOTA DEL TRACTO GASTROINTESTINAL.

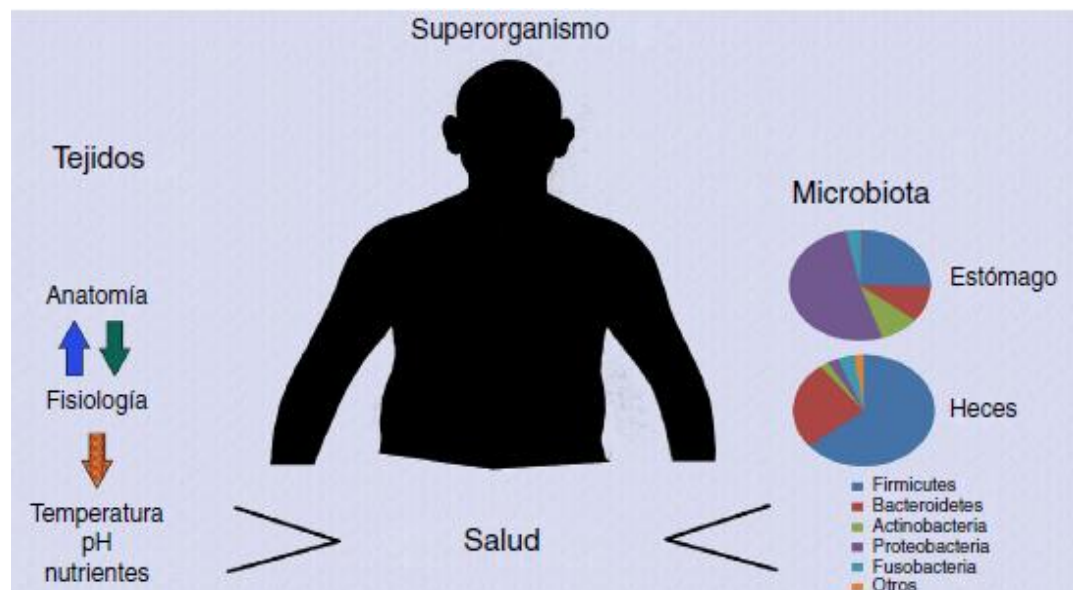
El tracto gastrointestinal (TGI) de los seres humanos y otros mamíferos es un órgano complejo cuya función principal consiste en extraer y asimilar los nutrientes contenidos en los alimentos, así como proteger de amenazas biológicas y no biológicas provenientes del exterior. Desde la boca hasta el ano, más de 10 trillones ($> 10^{13}$) de microorganismos habitan normalmente en el TGI de cada ser humano. (276) Esto supone que las células procariotas son más abundantes que las eucariotas propias del ser humano, y conforman casi un kilogramo del peso de un adulto normal. (277)

La “*flora normal*” ha sido el término más comúnmente usado en la literatura médica durante décadas para referirse a las comunidades microbianas que, de forma simbiote, conviven y se desarrollan en las diversas superficies (piel y mucosas) de nuestro organismo. Otros términos utilizados han sido el de “*microflora autóctona*” y más recientemente “*microbiota normal*”. Este último es el término más correcto ya que los términos “flora” y “microflora” tienen una desafortunada connotación botánica.

1.3.2. INFLUENCIA DE FACTORES GENÉTICOS Y AMBIENTALES EN LA MICROBIOTA INTESTINAL.

La presencia de formas de vida microscópicas en mucosas internas y externas se asocia a procesos de cooperación evolutiva: a lo largo del tiempo la asociación entre el hospedero humano y su microbiota asociada debió haber otorgado a ambos una ventaja en el ambiente, lo que permitió el éxito de su supervivencia como organismos simbioses. Debido a que las bacterias aparecieron en la Tierra millones de años antes que cualquier célula animal o vegetal, se cree que el TGI de humanos y otros animales fueron colonizados progresivamente por microorganismos ambientales. (278) Hoy en día, la microbiota GI se considera como otro sistema biológico dentro del cuerpo humano, impulsando a algunos investigadores a utilizar el término «superorganismo» (Figura 13) para definir la sólida asociación entre nuestros tejidos y los millones de virus, bacterias, archaeas y otros eucariotas microscópicos que cohabitan en ellos.

Figura 13. Superorganismo. El cuerpo humano (superorganismo, centro) está conformado por sus tejidos constituyentes (izquierda), cuyas características como temperatura, pH y disponibilidad de nutrientes están determinadas por la interrelación entre su anatomía y fisiología, y trillones de microorganismos (microbiota, derecha), cuya abundancia numérica supera por mucho la abundancia numérica de todas las células eucariotas que forman su hospedero. La estructura taxonómica y la actividad metabólica de la microbiota gastrointestinal varían grandemente dependiendo de la región anatómica donde habitan y de otros factores asociados con su hospedero. La salud del superorganismo depende de la homeostasis de sus tejidos y de su equilibrio con su microbiota. Las gráficas de pastel muestran la abundancia de filos bacterianos basados en Bik et al., 2006 (279) (estómago) y Lozupone et al., 2012 (280) (heces).



El TGI posee una microbiota autóctona que varía más entre individuos que dentro de un mismo sujeto a lo largo del tiempo. (281) Como veremos más adelante, esta variación depende de la región anatómica específica y puede ser afectada por la edad (282), la alimentación (283) y el consumo de antibióticos. (284)

Los cambios en la composición de la microbiota intestinal en respuesta a la ingesta alimentaria se llevan a cabo según las diferentes especies bacterianas estén mejor equipadas genéticamente para utilizar diferentes sustratos. (285) Muchos estudios han demostrado que un aumento en la ingesta de grasas produce un incremento en el índice de bacterias Gram-positivas / Gram-negativas.

Estudios recientes han encontrado que ratones libres de gérmenes (GF) en los que se sustituyó una dieta baja en grasas y rica en polisacáridos vegetales por una dieta rica en grasas y azúcares y baja en polisacáridos vegetales (dieta occidental), experimentaron un cambio de su microbiota en sólo 1 día, presentando entonces un incremento de bacterias del phylum Firmicutes y una disminución en Bacteroidetes. (286) (287) (288) También se encontraron cambios importantes de la microbiota

intestinal de los ratones tras sustituir una comida estándar por una dieta rica en grasa. Se asoció con una disminución de Bacteroidetes y un aumento tanto de Firmicutes como de Proteobacterias. Además, los estudios murinos han demostrado que las dietas reducidas en hidratos de carbono resultan en poblaciones enriquecidas por Bacteroidetes, (289) mientras que las dietas restringidas en calorías previenen el crecimiento de *C. coccoides*, *Bacillus*, *Lactobacillus* y *Bifidobacterias*, que son los principales productores de butirato necesarios para la homeostasis del colonocito. (290) Sólo un número limitado de ensayos clínicos en humanos han evaluado los efectos de los cambios en los hábitos alimentarios en la microbiota intestinal. (291) (292) (289) En un estudio de alimentación controlada en seres humanos que consumen una dieta alta en grasas / baja en fibra o baja en grasa / alta en fibra, se encontraron cambios notables en la microbiota intestinal en tan sólo 24 horas, destacando el rápido efecto que la dieta puede tener. (283)

Otro estudio demostró que los sujetos que consumen una dieta vegana o vegetariana tienen heces con un pH bajo así como recuentos significativamente menores de Bacteroides, Bifidobacterias, *E. coli* y Enterobacterias, respecto a controles. (293) Una dieta vegetariana también se ha demostrado que disminuye la cantidad y cambia la diversidad de *Clostridium IV* y *Clostridium XIV* y *XVII*. (294) Sin embargo, se necesitan grandes ensayos bien controlados para dilucidar los mecanismos que vinculan cambios en la dieta con alteraciones en la composición microbiana, así como las implicaciones que pudieran tener los cambios sobre la población diana tanto en salud como en enfermedad.

Uno de los hallazgos más sorprendentes es la pérdida de la diversidad de la microbiota intestinal en los países desarrollados. Uno de los factores implicados más importantes es el aumento del consumo de antibióticos. Hay evidencia de alteraciones significativas en la microbiota después de un tratamiento antibiótico (295) (296) (284) Aunque los taxones afectados varían entre los sujetos, algunos taxones no se recuperan incluso varios meses después del tratamiento, y, en general, hay una reducción a largo plazo en la diversidad bacteriana. (297) Recientemente se ha propuesto una correlación entre el consumo global creciente de antibióticos y el aumento de peso o la obesidad en los seres humanos. (298) Varios estudios han indicado que algunos antibióticos están asociados con el aumento de peso en los niños desnutridos, los recién nacidos y adultos, (299) (300) pero los mecanismos precisos por los cuales los antibióticos incrementan el

peso no están bien caracterizados. Se ha sugerido que los antibióticos, tales como la avoparcina (un glicopéptido estructuralmente relacionado a la vancomicina), ejercen una presión selectiva sobre las bacterias Gram-positivas y producen colonización por *Lactobacillus*, resistentes a glicopéptidos. Este antibiótico es usado como promotor del crecimiento en los animales. *Lactobacillus* se encuentra en una alta concentración en las heces de los pacientes obesos, por lo que podría ser responsable de la ganancia de peso observada en pacientes previamente tratados con vancomicina.

Otros estudios recientes también han demostrado en cambio, los efectos beneficiosos de los antibióticos sobre las anormalidades metabólicas en ratones obesos, dando lugar a una reducción de la intolerancia a la glucosa, el aumento de peso, la endotoxemia metabólica, y los marcadores de la inflamación y el estrés oxidativo. (301) Estos efectos se asociaron con una diversidad reducida de la microbiota intestinal. (302) El tratamiento antibiótico combinado con una dieta de protección de caseína hidrolizada se ha usado para disminuir la incidencia y retrasar la aparición de la diabetes en un modelo de rata. (303) Un estudio reciente informó de que también los seres humanos tratados con antibióticos mostraron una mayor y menos equilibrada capacidad anabólica de la glucosa que los individuos no tratados. (304) Sin embargo, la mayoría de los estudios clínicos se centran principalmente en la caracterización de la composición y la diversidad de los microbios del intestino, por lo que sigue siendo incierto si la alteración de la microbiota intestinal inducida por antibióticos en seres humanos con trastornos metabólicos se asocia con mejoría clínica tal y como se ha observado en animales.

Por otra parte, existen evidencias de que el genoma del hospedador puede ser un factor modulador de la composición de la microbiota gastrointestinal. (305) (306)

1.3.3. EL DESARROLLO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL.

La composición inicial de la microbiota del TGI se determina desde el nacimiento y depende fundamentalmente de dos factores: el tipo de parto y la alimentación. (307)

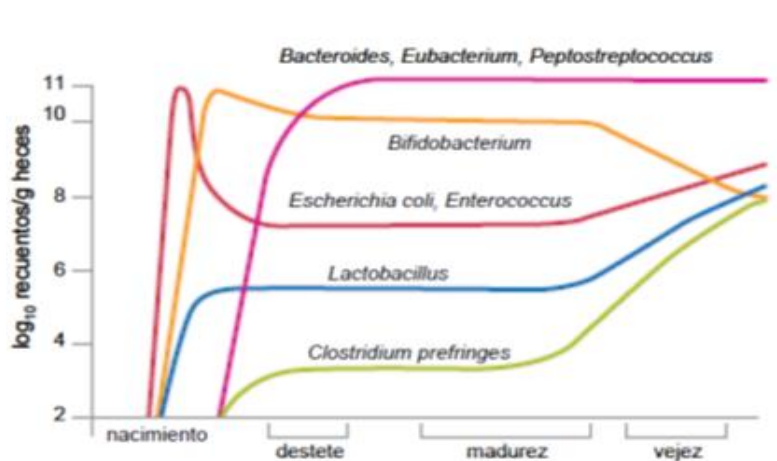
Si el parto se produce de forma natural, el TGI del recién nacido es colonizado por la microbiota vaginal y/o intestinal de la madre y por los microorganismos del ambiente. (308) (309) Así, la microbiota intestinal inicial está formada por bacterias anaerobias facultativas; coliformes y estreptococos principalmente. Estas bacterias crean un ambiente reductor favorable para el desarrollo de los microorganismos anaerobios, de manera que las bifidobacterias pueden alcanzar al cabo de la primera semana de vida niveles de 10^8 - 10^{11} UFC/g de heces. Cuando el parto se produce por

cesárea, el establecimiento de la microbiota normal se retrasa, ya que la colonización microbiana depende exclusivamente del medio externo. En este caso las poblaciones microbianas son diferentes a las que se desarrollan cuando el parto es natural, con un menor desarrollo de microorganismos anaerobios estrictos, sobre todo del grupo de los bacteroides. **(310)**

La alimentación es determinante también en la evolución de esta microbiota, tal y como se ha demostrado en estudios comparativos entre niños con alimentación materna y niños alimentados con leche de fórmula. **(311)** En la microbiota de los primeros dominan las poblaciones de bifidobacterias, mientras que la presencia de clostridios y coliformes es más baja. Por el contrario, los bebés alimentados con leche de fórmula presentan una microbiota más compleja con presencia de bacteroides, bifidobacterias, clostridios, estreptococos y coliformes en proporciones similares. **(312)** **(311)** Tras el destete, coincidiendo con la introducción de los suplementos alimenticios, se empieza a desarrollar una microbiota mucho más diversa. A partir de los dos años, la microbiota del niño va evolucionando hacia la que será la microbiota del adulto. El número de bacteroides y cocos Gram-positivos anaerobios aumenta hasta incluso superar a las bifidobacterias, mientras que los coliformes y estreptococos disminuyen. **(313) (314)**

Aunque la mayoría de los autores sostienen que el feto en el útero es estéril y la colonización del recién nacido se produce fundamentalmente por la microbiota del canal del parto, otros estudios parecen apuntar a que la leche materna podría ser también una fuente de microorganismos. **(315)** Estos autores especulan sobre el posible paso de bacterias a través del epitelio intestinal de la madre hacia otras localizaciones como las glándulas mamarias, desde donde alcanzarían el intestino de los lactantes.

En la **Figura 14** se muestra la evolución de los principales grupos microbianos intestinales desde el nacimiento a la vejez.

Figura 14. Evolución de la microbiota intestinal con la edad.

1.3.4. CARACTERÍSTICAS Y COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL.

De entre las más de 400 especies descritas en el TGI, unas 30 o 40 representan el 99% de los microorganismos y constituyen la microbiota normal, compuesta mayoritariamente por bacterias. Otros dominios principales los componen Eukarya y Archaea.

La microbiota aumenta en complejidad y densidad a medida que avanzamos por el TGI. Así, la cavidad oral de humanos contiene más de 600 especies de bacterias pertenecientes a más de 10 filos, (316) el estómago contiene al menos 5 diferentes filos, decenas de familias y cerca de 200 especies de bacterias, (279) aunque, debido a la secreción de ácido gástrico, únicamente se desarrollan especies resistentes a pH ácido como estreptococos y lactobacilos, (317) incluyendo *Helicobacter pylori*, la cual es considerada como carcinógeno del grupo I y agente causal de cáncer, úlceras gástricas y duodenales. (318) En el intestino delgado los niveles aumentan progresivamente, desde 10^4 unidades formadoras de colonia (UFC) por gramo de contenido en la parte superior (duodeno), donde son mayoritarios nuevamente los lactobacilos y los estreptococos, (319) hasta 10^8 UFC/g en la región distal del íleon. Las especies cultivables más numerosas en esta región son las bifidobacterias, enterobacterias, bacteroides y fusobacterias. (320) (321) Los principales factores limitantes para el establecimiento de los microorganismos en el intestino delgado son los movimientos peristálticos y la secreción de jugos pancreáticos y biliares.

El mayor número y diversidad de bacterias en el TGI humano reside en el intestino grueso, (322) donde constituyen entre el 35 y el 50% del volumen del contenido sólido. (323)

Desde un punto de vista fisiológico y evolutivo, es razonable encontrar una mayor diversidad y cantidad de especies bacterianas en un ambiente prácticamente estable de humedad, temperatura, y rico en nutrientes, tal y como el intestino grueso.

En el colon existe un ambiente muy reductor y desprovisto de oxígeno por lo que la mayoría de las poblaciones son anaerobias estrictas y constituyen lo que se denomina la **microbiota dominante**, caracterizada por concentraciones del orden de 10^9 - 10^{12} UFC/g. Dentro de esta microbiota, el género Bacteroides (constituido por bacilos Gram-negativos no esporulados) es uno de los más abundantes, constituyendo el 10% en la proporción de la microbiota. También son dominantes otros microorganismos Gram-positivos no esporulados pertenecientes a los géneros Firmicutes (60%), Actinobacteria (10%), Eubacterium, Bifidobacterium, Peptostreptococcus y Ruminococcus. (324) Los Firmicutes están representados esencialmente por géneros como los clostridios, Mycoplasma y Bacillus. En concentraciones inferiores aparecen poblaciones de bacterias anaerobias facultativas como enterobacterias, enterococos, lactobacilos y estreptococos que constituyen la **microbiota subdominante**, con tasas comprendidas entre 10^5 y 10^8 UFC/g. (325)

En la **Tabla 14 (325) (326)** se representan grupos microbianos habituales en heces humanas, los cuales se consideran un reflejo de la microbiota del colon.

Tabla 14. Microorganismos detectados comúnmente en heces humanas y su concentración.

Grupo microbiano	Número (UFC/g)
Bacteroides	10^9 - 10^{12}
Bifidobacterias	10^9 - 10^{11}
Eubacterias	10^9 - 10^{11}
Peptoestreptococos	10^9 - 10^{11}
Peptococos	10^9 - 10^{11}
Ruminococos	10^5 - 10^{11}
Fusobacterias	10^6 - 10^{10}
Clostridios	10^6 - 10^9
Lactobacilos	10^5 - 10^8
Enterobacterias	10^5 - 10^8
Enterococos	10^5 - 10^7
Estreptococos	10^3 - 10^5
Levaduras	10^2 - 10^5
Estafilococos	0 - 10^4

La presencia de determinados núcleos bacterianos (géneros y especies concretas), así como de sus determinadas funciones metabólicas, permite definir una microbiota saludable en cualquier parte del tracto gastrointestinal. Ejemplos de taxones bacterianos que se han asociado con la salud y un adecuado funcionamiento digestivo son *Bacteroides*, *Bifidobacterium* y *Clostridium* (cepas productoras de butirato: XIVa y IVa) **(327)**

En términos de composición bacteriana, la microbiota de un individuo sano está dominada por los filos Firmicutes y Bacterioidetes (los más abundantes en el colon, como ya se ha comentado), seguidos por Actinobacteria y Verrucomicrobia. **(328)** El filo Proteobacteria supone una pequeña parte de las bacterias intestinales en personas sanas; sin embargo, se han encontrado porcentajes mayores en pacientes con diversas patologías gastrointestinales. **(329)**

Menos del 0,1% está compuesta por patógenos primarios de sobra conocidos, como *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica* y *Vibrio cholerae*.

Para intentar sistematizar su estudio y comprensión se han descrito 3 «enterotipos» principales en adultos sanos. **(330)**

En el primero predominan las bacterias del género *Bacteroides*, en el segundo las del género *Prevotella* y en el tercero existe una alta proporción del género *Ruminococcus*.

Estos enterotipos poseen distintas capacidades metabólicas y parecen ser independientes del sexo o de la edad del humano albergador; sin embargo, se ha observado que determinados tipos de dietas pueden contribuir a largo plazo al desarrollo de algún enterotipo concreto. **(331)**

1.3.5. FUNCIONES DE LA MICROBIOTA INTESTINAL.

La microbiota bacteriana del TGI aporta indirectamente más de 9 millones de genes al hospedero humano, **(332)** proporcionando así características funcionales únicas a nuestro sistema inmune y digestivo.

En años recientes se han adquirido suficientes conocimientos para poder afirmar que las funciones del tubo digestivo, nutrición y defensa, dependen no solo de las estructuras propias (barrera mucosa, glándulas secretoras, sistema inmune de las mucosas) sino también de la presencia y actividad de las comunidades microbianas que colonizan el intestino. La microbiota intestinal es un órgano más, perfectamente integrado en la fisiología del individuo. Tubo digestivo y microbiota son interdependientes y hay

evidencias que sugieren que su equilibrio condiciona la homeostasis del individuo dentro de su entorno ambiental.

1.3.5.1. Capacidad metabólica de la microbiota intestinal

La microbiota normal afecta a la estructura anatómica y fisiológica del intestino, aumentando la superficie de absorción y promoviendo la renovación de las células de las vellosidades. Además los microorganismos del TGI aumentan el contenido intraluminal y aceleran el tránsito intestinal. Se ha postulado incluso que los microorganismos interactúan con el hospedador modulando la expresión de genes relacionados con diversas funciones intestinales. **(333)**

Los microorganismos constituyen un enorme potencial enzimático en el intestino, desempeñando una amplia variedad de funciones metabólicas. Una de las más importantes es la hidrólisis o degradación de los componentes de la dieta (glúcidos, proteínas, lípidos). A través de este proceso se obtiene energía y nutrientes, tanto para los propios microorganismos intestinales como para el hospedador. La fermentación de los carbohidratos resulta en una disminución del pH y la producción de metabolitos como los ácidos grasos de cadena corta (AGCC). Los AGCC más abundantes en el intestino son el acético, el butírico y el propiónico y tienen una gran importancia en la fisiología y nutrición del TGI. La mayor parte de los AGCC producidos en el colon se absorben en la mucosa. El epitelio del colon consume casi por completo el butirato formado, constituyendo la principal fuente de energía para los colonocitos. El butirato se ha relacionado también con la reversión de células neoplásicas, pudiendo participar en la prevención de procesos cancerígenos. **(334) (335)** El acetato y el propionato, por su parte, pasan a la circulación portal y se consumen en el hígado o en los tejidos periféricos. La degradación de las proteínas por la microbiota (putrefacción) también genera AGCC, pero produce al mismo tiempo una serie de compuestos secundarios potencialmente tóxicos como aminas, amonio, fenoles, tioles e índoles. **(336)**

La capacidad metabólica de estos microorganismos incluye también la degradación de determinados compuestos tóxicos, favoreciendo de esta manera la eliminación de sustancias carcinogénicas y/o mutagénicas. **(337)** En otras ocasiones, el metabolismo bacteriano puede dar lugar a la formación de metabolitos más tóxicos que los compuestos originales. **(338)**

Los microorganismos en el intestino pueden participar igualmente en la síntesis de vitaminas (339) y favorecer la absorción de diversos minerales como calcio, fósforo, magnesio y hierro. (340)

En el intestino delgado el ambiente es fundamentalmente oxigénico y la mayoría de las reacciones microbianas son hidrolíticas. Por el contrario, el intestino grueso es anóxico y las reacciones bioquímicas son normalmente reductoras, aunque existen grandes diferencias en función de la sección del colon. Los productos de la fermentación de carbohidratos (AGCC, gases y etanol) están presentes en altas concentraciones en el ciego y colon ascendente, donde la disponibilidad de sustratos es mayor. Por el contrario, los productos de la degradación de proteínas (amonio, ácidos grasos de cadena ramificada, compuestos fenólicos y sulfurados volátiles) se producen fundamentalmente en el colon descendente. (341)

1.3.5.2. Protección contra los microorganismos externos

La microbiota intestinal es un elemento muy importante en la barrera de defensa de la mucosa. De hecho, se ha demostrado que los animales criados en un ambiente estéril son más susceptibles de padecer infecciones. Esto se debe a que en un ecosistema estable constituido por bacterias comensales, estas compiten con las bacterias patógenas por los nutrientes y los espacios libres. Además, el epitelio intestinal produce sustancias que inhiben el crecimiento de los microorganismos patógenos y de otras bacterias transitorias del exterior que no forman parte de la microbiota intestinal, por lo que la posibilidad de que esos microorganismos patógenos puedan invadir la mucosa es limitada. (342)

1.3.5.3. Maduración y función del sistema inmune de la mucosa

La presencia de microbiota en el intestino tiene un impacto decisivo sobre el desarrollo y maduración del sistema inmune. (343) La concepción de que el sistema inmune se desarrolla en respuesta a estímulos infecciosos provocados por microorganismos patógenos no parece sostenerse. Se ha demostrado que la colonización intestinal permanente por bacterias comensales, no necesariamente patógenas, es el factor esencial. Los animales criados en condiciones de asepsia estricta muestran atrofia del sistema inmune de las mucosas (folículos linfoides de tamaño pequeño, escasez de linfocitos intraepiteliales y de la lámina propia) y también del sistema inmune sistémico (ganglios linfáticos de menor tamaño, bajo nivel de inmunoglobulinas). La colonización

bacteriana incrementa rápidamente el número de linfocitos de la mucosa, los centros germinales de los folículos linfoides y ganglios crecen en número y tamaño, aparecen células productoras de inmunoglobulinas en la lámina propia, y los niveles de inmunoglobulinas séricas se normalizan. (344) La inducción y regulación del sistema inmune depende de la colonización bacteriana del tracto digestivo.

La superficie de la mucosa del tracto digestivo es un área dotada de estructuras adaptadas a funciones de contacto y comunicación entre el individuo y el medio externo. Esta comunicación incluye el reconocimiento inmunológico de las sustancias del exterior que transitan por el tubo digestivo. (343)

Para la perfecta homeostasis, el sistema tiene que distinguir claramente entre patógenos o patógenos potenciales, de un lado, y microbios comensales en simbiosis con el anfitrión, de otro. En el primer caso, el organismo debe dotarse de elementos de defensa adecuados, mientras que en el segundo caso, el anfitrión tiene que saber tolerar para obtener el beneficio de la simbiosis. Las interacciones entre los microorganismos, el epitelio y los tejidos linfoides intestinales son múltiples, diversas en sus características y continuas, de modo que remodelan constantemente los mecanismos locales y sistémicos de la inmunidad adaptándolos al ambiente microbiano. (345)

Los enterocitos del epitelio de la mucosa intestinal tienen un papel muy importante en la logística del sistema inmune. Su posición en primera línea y en contacto con la luz intestinal es crucial para el reconocimiento inicial de moléculas foráneas y para la generación de señales que se transmiten a las células inmunocompetentes del tejido subyacente. La activación de los mecanismos de defensa depende en primer lugar del reconocimiento rápido de riesgo a través de receptores innatos o pre-formados que detectan componentes estructurales comunes a bacterias o virus. (346) Esto se realiza en el medio extracelular mediante los Toll-like-receptors (TLR) de la membrana, y en el medio intracelular mediante las proteínas tipo NOD del citosol. La activación de estos sensores por invasión bacteriana genera inmediatamente señales que convergen en la migración de factores de transcripción (NF-kappaB y otros) al núcleo celular, donde activan la expresión de genes responsables de la síntesis de proteínas proinflamatorias, básicamente citoquinas y enzimas inducibles con capacidad para generar mediadores inflamatorios. De este modo, las células epiteliales emiten señales con capacidad de atraer y activar leucocitos, aumentar el flujo sanguíneo, incrementar la permeabilidad capilar, etc.

Los enterocitos pueden actuar como células presentadoras de antígenos, sugiriendo que su rol no se limita a la defensa innata sino que también participan en el escalón inicial de las respuestas de tipo adquirido (expansión de clones linfocitarios específicos y generación de anticuerpos).

La mucosa intestinal cuenta con elementos y estructuras de tejido linfoide inmuno-competente con funciones especializadas de defensa adquirida. (343) El llamado ‘sistema inmune de las mucosas’ incluye tres compartimentos diferenciables anatómicamente: estructuras organizadas (placas de Peyer y folículos linfoides), lámina propia y epitelio superficial. Las estructuras organizadas son lugares de inducción, mientras que la lámina propia y el compartimiento epitelial contienen células maduras y efectoras. Las estructuras organizadas están cubiertas por epitelio especializado (células M, de morfología característica), que transporta microorganismos o estructuras antigénicas desde la luz hasta el tejido linfoide subyacente. La inducción de respuestas inmunes de tipo adquirido es un fenómeno que tiene lugar principalmente en las estructuras foliculares de la mucosa intestinal. Los antígenos procesados por células presentadoras de antígenos (por ejemplo, células dendríticas) se presentan a linfocitos T en estado naïve, y se activa la expansión de los clones más afines al antígeno. La expansión clonal de células T da lugar a linfocitos helper (células Th) de distinto fenotipo: Th1, Th2 o T reguladoras (Th3, Tr1 o células CD4-CD25). Las células T reguladoras desempeñan un papel central en inmunotolerancia porque segregan citocinas reguladoras, de carácter antiinflamatorio (IL-10, TGF-beta), en respuesta a antígenos que se reconocen como no patógenos. En condiciones normales, predomina un contexto de inmunotolerancia probablemente mediado por células T reguladoras. Este contexto de inmunotolerancia permite la exposición continua a una carga antigénica abrumadora (microbiota, comida, antígenos ambientales), sin que por ello se desencadenen reacciones inflamatorias que lesionarían al tejido intestinal propio. (345) (347) (348)

1.3.6. IMPLICACIONES DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN LA SALUD.

Entre los posibles efectos perjudiciales podemos incluir infecciones intestinales, infecciones extraintestinales y carcinogénesis.

1.3.6.1. Infecciones gastrointestinales

Infecciones por microorganismos enteropatógenos. Un porcentaje importante de los viajeros que visitan áreas geográficas de alto riesgo infeccioso desarrollan diarreas agudas, denominadas diarrea del viajero. La causa de la mayor parte de estas diarreas es una infección por *E. coli* o diversas especies de shigelas y salmonelas. (349)

Infecciones por rotavirus. Las infecciones por rotavirus son la mayor causa de las diarreas graves durante la infancia y la adolescencia. Desde el punto de vista clínico, la mucosa intestinal se ve afectada y se modifica la composición de la microbiota intestinal, lo que da lugar a un episodio de diarrea osmótica seguida de un crecimiento excesivo de alguna de las poblaciones bacterianas no dominantes. (350)

Diarrea por *Clostridium difficile* asociada al tratamiento con antibióticos. Uno de los desórdenes intestinales más importantes y mejor documentados es la diarrea asociada al tratamiento con antibióticos. La incidencia de esta diarrea se sitúa entre un 5 y un 25% de los casos de la terapia antibiótica, siendo mucho más frecuente cuando se utilizan antimicrobianos de amplio espectro. El tratamiento con antibióticos perturba el balance de la microbiota intestinal normal permitiendo la proliferación de patógenos emergentes como *Cl. difficile*, causante de la colitis pseudomembranosa que se produce entre el 10 y el 20% de estas diarreas. (351)

Infecciones por *Helicobacter pylori*. *H. pylori* es una bacteria espiral Gram-negativa que coloniza la mucosa gástrica humana. Este microorganismo se ha asociado con el desarrollo de gastritis crónicas, úlceras pépticas y cáncer gástrico. Uno de sus principales factores de patogenicidad es la presencia de la enzima ureasa que hidroliza la urea generando amonio, de forma que el pH local aumenta y se favorece la colonización y la proliferación del microorganismo. (352)

1.3.6.2. Enfermedades de base inmunológica

En las sociedades desarrolladas, la incidencia de alergias y de algunas enfermedades con componentes autoinmunes ha crecido de modo importante durante la segunda mitad del siglo XX. La hipótesis de la higiene excesiva sugiere que la falta de exposición a agentes bacterianos en las edades tempranas de la vida podría estar en la base de la creciente aparición de disfunciones del sistema inmunológico. (353)

En la actualidad numerosos estudios tratan de clarificar y establecer las posibles relaciones de los microorganismos o sus productos con los trastornos gastrointestinales no infecciosos.

Síndrome del intestino irritable. Una de las causas más comunes de problemas gastrointestinales es el síndrome del intestino irritable. La enfermedad se caracteriza por una alteración de la actividad motora en todo el intestino, aunque gran parte de los síntomas se sitúan en el colon. La prevalencia de esta patología en países industrializados se ha estimado en torno a un 10% de la población. (354) Su etiología es hasta el momento desconocida, pero aparece con frecuencia después de una gastroenteritis o tras el tratamiento con antibióticos, (355) por lo que se ha asociado con alteraciones en la microbiota intestinal. (356) (357) La hipersensibilidad a alimentos, variables psicosociales como el estrés o defectos en neurotransmisores han sido propuestos también como posibles factores que favorecerían su desarrollo o su sintomatología. (358)

Enfermedad inflamatoria intestinal. Enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa. La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es una patología crónica que afecta al colon y/o al intestino delgado. Dentro de este término se engloban dos enfermedades comunes que afectan al 0,1% de la población en las sociedades occidentales y que presentan una incidencia en aumento: la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa. La etiología es todavía poco clara, aunque en ambos casos parece demostrado que el sistema inmune reacciona de manera anormal contra algunos componentes de la microbiota intestinal. Se ha comprobado en ratones que la colonización intestinal por bacterias anaerobias, especialmente del género Baceoides, podría promover la producción de citoquinas proinflamatorias que median el desarrollo de una colitis crónica semejante a la humana. (359) Además, en algunos pacientes con EII se ha encontrado una significativa producción sistémica de anticuerpos contra Bacteroides ovatus. (360)

Alergias o enfermedad atópica. La alergia o enfermedad atópica en sus distintas formas de presentación (eczema atópico, rinitis alérgica o asma) es una disfunción crónica de importancia creciente en los países desarrollados. La dermatitis atópica afecta en la actualidad al 15-20% de los niños. (361) Estudios poblacionales parecen indicar que una exposición adecuada a los microorganismos en las primeras etapas de la vida protege contra diversos episodios alérgicos. (362) (363) Esto sería debido al papel crucial que las bacterias intestinales tienen en la maduración del sistema inmune.

1.3.6.3. Cáncer de colon

En el desarrollo de cáncer de colon parecen estar implicados factores de interacción entre la microbiota colónica, la dieta y el epitelio del colon. (364) Diversos estudios

llevados a cabo con modelos animales han asociado algunos tipos de tumores con ciertas actividades enzimáticas de las bacterias intestinales. Algunas de las enzimas bacterianas implicadas en la generación de mutágenos, carcinógenos y promotores de tumores son: la β -glucuronidasa, la β -glucosidasa, la nitrorreductasa y la azorreductasa. (365) Por el contrario, se ha observado que el butirato producido por ciertas poblaciones intestinales es un inductor de la diferenciación celular y en varios estudios se ha relacionado con la reversión de células neoplásicas en el colon. (335) De esta forma el efecto protector de la fibra dietaria en el cáncer de colon se asocia con una mayor producción de butirato. (366)

1.3.6.4. Enfermedades metabólicas

En las últimas décadas se ha visto un aumento en la prevalencia de enfermedades metabólicas en los países desarrollados. Factores ambientales, como el incremento en la ingesta de energía y la disminución de la actividad física, se han considerado causas fundamentales. Sin embargo, incluso cuando la ingesta de energía no aumenta y la actividad física no disminuye, la prevalencia sigue creciendo de manera exponencial, por lo que hay que tener en cuenta otros factores ambientales, incluyendo cambios en la microbiota intestinal. Además, y, aunque se ha producido un cambio drástico en los hábitos de alimentación en el que fibra dietética se ha sustituido por una dieta rica en grasa, este concepto no puede explicar por qué algunas personas son sensibles y otras son resistentes al desarrollo de estas enfermedades metabólicas.

Uno de los retos es dilucidar el origen molecular de enfermedades metabólicas, aunque la gran diversidad y las diferencias sociales entre los seres humanos hacen esto difícil. A pesar de los grandes esfuerzos y la identificación de algunas mutaciones en el genoma, ninguna visión global se ha establecido aún. El descubrimiento de genes candidatos en los estudios de asociación pangenómica ha ayudado a identificar nuevos genes asociados a la sensibilidad / resistencia a la diabetes y fenotipos metabólicos extremos.

Hay, por tanto, una necesidad de encontrar un nuevo paradigma que tenga en cuenta la diversidad genética, el impacto factor ambiental, el rápido desarrollo de enfermedades metabólicas, y el comportamiento individual de desarrollar obesidad y/o diabetes.

1.3.6.4.1. Microbiota y obesidad

Una nueva teoría muestra a la microbiota como contribuyente en la regulación de la homeostasis energética. Por lo tanto, y junto con las vulnerabilidades ambientales, la microbiota intestinal podría provocar un desequilibrio homeostático.

El primer descubrimiento se relacionó con el hecho de que los ratones con una mutación en el gen de la leptina (ratones metabólicamente obesos) tenían diferente microbiota en comparación con otros ratones sin la mutación. (367) En este modelo animal obeso, la proporción de los filos dominantes en el intestino, Bacteroidetes y Firmicutes, es modificada, con una reducción significativa en Bacteroidetes y un aumento correspondiente en Firmicutes. (368) Ley et al. (328) fueron los primeros en reportar una microbiota intestinal alterada similar a la encontrada en los ratones obesos (una mayor proporción de Firmicutes y relativamente menos Bacteroidetes) en 12 sujetos obesos comparados con 2 controles. Más tarde, Arumugam et al. (369) confirmaron una reducción en Bacteroidetes acompañado de un aumento en *Lactobacillus* pertenecientes al phylum Firmicutes. Turnbaugh et al. (287) y Furet et al. (370) mostraron un patrón diferente, basado en una representación inferior de Bacteroidetes (*Bacteroides* / *Prevotella*) en individuos obesos pero sin diferencias en Firmicutes. Collado et al. (371) reportaron aumentos en las especies que pertenecen a ambos Firmicutes (*Staphylococcus aureus*) y Bacteroidetes (*Bacteroides*/ *Prevotella*) en las mujeres con sobrepeso. Million et al. (372) describieron los cambios en la composición de Firmicutes en base a un aumento en *Lactobacillus reuteri*, junto con una reducción en *L. paracasei* y *L. plantarum*. Por último, otros estudios no han encontrado diferencias entre Firmicutes y Bacteroidetes a nivel phylum. (373) (374) (375)

La abundancia de Firmicutes se asocia con su mayor capacidad de obtener energía de los alimentos y de provocar un bajo grado de inflamación. El aumento en Firmicutes y la disminución en la proporción de Bacteroidetes observado en los ratones obesos podría estar relacionado con la presencia de genes que codifican enzimas que descomponen los polisacáridos que no puede ser digeridos por el huésped, el aumento de la producción de monosacáridos y AGCC y la conversión de estos AGCC a los triglicéridos en el hígado. Estos AGCC son capaces de unirse y activar dos receptores acoplados a proteína G (GPR41 y GPR43) de las células epiteliales intestinales. La activación de estos receptores induce la secreción de péptido YY, que suprime la motilidad intestinal y retrasa el tránsito intestinal. Por este mecanismo de AGCC-

vinculado a la activación de los receptores acoplados a la proteína G, la microbiota intestinal puede contribuir notablemente a una mayor absorción y depósito de nutrientes, lo que contribuye al desarrollo de trastornos metabólicos. **(376)** Por otra parte, la microbiota intestinal también se han demostrado que disminuye la producción del factor adiposo inducido por ayuno (FIAF); una lipoproteína lipasa (LPL) secretada por las células intestinales. La inhibición de la actividad de la LPL aumenta el almacenamiento de triglicéridos derivados del hígado. **(377)**

Turnbaugh et al. **(378)** en un estudio con ratones ob / ob, encontró un contenido calórico reducido en las heces de los ratones obesos, en comparación con los ratones delgados. Otros estudios han sugerido que los sujetos obesos podrían ser capaces de extraer más energía de los nutrientes debido a la transferencia de hidrógeno entre taxones. De hecho, un aumento simultáneo de bacterias productoras de hidrógeno (Prevotella) y de bacterias consumidoras de hidrógeno (Archaea) se ha asociado previamente con la obesidad por Zhang et al. **(379)** Estos hallazgos están de acuerdo con la observación de que los ratones GF alimentados con una dieta rica en grasas ganaron menos peso que los ratones convencionales. **(380)**

El experimento más relevante respecto a la relación de causalidad entre la microbiota y la obesidad fue realizado por Turnbaugh et al. **(378)** En este estudio demostraron que el trasplante de microbiota de ratones genéticamente obesos a ratones GF provoca un aumento de peso muy significativo en comparación con los ratones GF trasplantados con la microbiota de ratones delgados.

Sorprendentemente, el fenotipo con mayor capacidad de obtención energética se transmite simplemente mediante el trasplante de la microbiota intestinal desde obesos a donantes sanos y delgados. **(378)** **(381)** Kalliomäki et al. **(382)** realizaron un estudio prospectivo en el que siguieron a 49 niños desde el nacimiento hasta los 7 años de edad. Se recogieron sus heces a los 6 y 12 meses de vida y se encontró que los niños que a los 7 años de edad tenían un peso normal tenían un mayor número de Bifidobacterias y un menor número de Staphylococcus aureus respecto a los niños que presentaron sobrepeso varios años después. Los autores concluyeron que la alteración en la microbiota precede a la alteración en el peso, una explicación relevante para la prevención de la obesidad. Los autores también propusieron que el Staphylococcus aureus puede actuar como un inductor de inflamación de bajo grado, contribuyendo al desarrollo de la obesidad. **(382)**

Publicaciones recientes revelan que Bifidobacterias y Lactobacillus pueden tener características diferentes según la especie. Por ejemplo, dentro del género Lactobacillus, *L. plantarum*, *L. paracasei* se han asociado con la delgadez, mientras que *L. reuteri* se asocia con la obesidad. (372) Los Lactobacillus asociados a delgadez han desarrollado mecanismos de defensa para mejorar la glucólisis y proteger contra el estrés oxidativo, mientras que los Lactobacillus asociados a obesidad poseen una capacidad limitada para descomponer la fructosa o la glucosa y podrían reducir los efectos de freno a nivel ileal. (383)

1.3.6.4.2. Microbiota y DM tipo 2

La DM tipo 2 es la consecuencia de un aumento en la producción de glucosa en el hígado y una déficit en la secreción y acción de la insulina. Otras funciones fisiológicas están alteradas, tales como el sistema nervioso central y autónomo, que conduce a un deterioro de la secreción de hormonas como el glucagón y las incretinas. Sin embargo, una característica común de la obesidad y la DM2 es la presencia de un componente inflamatorio de bajo grado que se describe en tejidos implicados en la regulación del metabolismo, tales como el hígado, tejido adiposo, y los músculos. (384) Esta inflamación metabólica se caracteriza por un exceso moderado de la producción de citoquinas, incluyendo la IL-6, IL-1, o TNF- α , que lesiona las señales de insulina celular y contribuye a la resistencia insulínica y la diabetes. (385) (386)

El aumento de peso sería un factor precipitante de esta inflamación de bajo grado. Cuando la hipertrofia de los adipocitos se produce como una respuesta a la ingesta excesiva de energía, un aumento en la producción de TNF- α en el tejido adiposo se produce de forma consecuente y esto estimula la producción de factores quimiotácticos conllevando un infiltrado en el tejido adiposo de macrófagos proinflamatorios que producen un aumento de la producción de IL-6 y IL-1.

Recientemente, dos estudios han demostrado que la microbiota intestinal podría ser un contribuyente importante para el desarrollo de DM 2. Ambos estudios demostraron que los sujetos con DM 2 se caracterizan por una reducción en el número de bacterias Clostridiales (especies *Roseburia* y *Faecalibacterium prausnitzii*), productoras de butirato. (387) (388) Otro estudio encontró cambios en la microbiota en pacientes con diabetes o resistencia a la insulina en comparación con los sujetos sin alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos. (389) Además, cambios en la cantidad de Bifidobacterias, Lactobacillus y Clostridium, así como una disminución en

la proporción de Firmicutes-Bacteroidetes se han reportado recientemente en niños con DM 1. Este estudio también mostró que las bacterias que participan en el mantenimiento de la integridad intestinal fueron significativamente inferiores en los pacientes diabéticos que en los controles sanos. (390) Cambios similares en la composición de la microbiota intestinal también se han objetivado en pacientes con DM2. (391) (387)

Varios estudios que relacionan la microbiota intestinal con trastornos metabólicos como la obesidad, la resistencia a la insulina y la diabetes mellitus, han sido revisados por distintos autores. (392) (393) (394) Por otra parte, están en estudio los tratamientos con probióticos (395) y prebióticos (396) para el control de la microbiota intestinal y las enfermedades metabólicas.

Se han propuesto varios mecanismos para explicar la influencia de la microbiota en la resistencia a la insulina y la DM2, como la endotoxemia metabólica, modificaciones en la secreción de la incretinas y en la producción de butirato.

Los lipopolisacáridos (LPS) son endotoxinas que se encuentran comúnmente en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. Causan endotoxemia metabólica, caracterizada por la liberación de citoquinas proinflamatorias. (397) Un aumento en los niveles de LPS se ha observado en los sujetos con alto consumo de grasas. (398) Estos hechos sugieren que un cambio en la proporción de bacterias Gram-negativas o un cambio en la permeabilidad intestinal son producidos por el aumento de LPS en el suero, (399) (400) y este aumento, está directamente relacionado con el grado de resistencia a la insulina.

Canis et al. (401) (396) informó que la modulación de la microbiota intestinal mediante el uso de prebióticos en ratones obesos actúa favorablemente sobre la barrera intestinal, reduciendo el contenido de LPS y la inflamación sistémica y hepática inducidas por la dieta rica en grasa. Los LPS son absorbidos por los enterocitos y se transportan en el plasma unidos a los quilomicrones. (402) De esta manera, las grasas dietéticas pueden estar asociadas con un incremento de absorción de LPS que a su vez puede estar relacionado con los cambios en la microbiota intestinal, destacando una disminución en *Eubacterium rectale*, *C. coccoides*, *Bacteroides* y *Bifidobacterias* Gram-negativas. (392) Este papel causal de los LPS se demostró mediante la infusión de LPS en ratones con una dieta normal, induciendo de forma secundaria resistencia a la insulina hepática, intolerancia a la glucosa, y un aumento en el peso del tejido adiposo.

(401) Se ha demostrado recientemente que la cascada de señalización inducida por LPS a través de TLR4 deteriora la función de las células β de páncreas a través de la supresión de la secreción de insulina inducida por glucosa y la disminución de la expresión del ARNm del páncreas- duodeno homebox-1 (PDX-1) (403)

LPS se une al receptor CD14 / TLR4 de los macrófagos y produce un aumento en la producción de moléculas proinflamatorias. Cuando se administró la infusión de LPS a ratones con ausencia genética del receptor CD14 / TLR4 no se desarrolló DM2 ni obesidad, lo que muestra el importante papel de los LPS en el mecanismo de CD14 / TLR4. Por otra parte, ratones Knockout CD14 /TLR4 fueron aún más sensibles a la insulina que los controles de tipo salvaje. (401)

1.3.6.4.3. Microbiota y enfermedad hepática

La enfermedad hepática crónica se ha asociado con cambios en el intestino. La translocación microbiana definida como la penetración de microbios comensales viables o sus productos (también llamados patrones moleculares asociados a patógenos o PAMPs) a través de la barrera intestinal hasta los ganglios linfáticos mesentéricos es común en pacientes con cirrosis hepática. La tasa de infecciones bacterianas es tan alta como 34% por año en los pacientes con cirrosis avanzada. (404)

Sin embargo, la translocación bacteriana no es sólo habitual en etapas avanzadas de la enfermedad hepática crónica causando infecciones espontáneas, sino que también se produce en fases tempranas. Los pacientes con enfermedad hepática muestran una alteración de la barrera intestinal y altos niveles de productos bacterianos en la circulación sistémica, lo que se correlaciona con la gravedad de la enfermedad hepática. La translocación de productos microbianos bacterianos que llegan al hígado a través de la vena porta o los conductos linfáticos producen que se activen numerosos receptores hepáticos de sistema inmune innato. Aunque la activación de estos receptores podría ser beneficiosa y protectora contra las infecciones agudas, la activación persistente contribuye a la lesión hepática y a la progresión de la enfermedad. La reducción de la carga bacteriana intestinal mediante el uso de antibióticos no absorbibles disminuye la translocación bacteriana y previene la enfermedad hepática en modelos animales experimentales, mejorando los parámetros clínicos en pacientes. La eliminación genética o mutación de los receptores para ligandos bacterianos o moléculas de señalización de estas vías demuestran de manera convincente la participación de

moléculas microbianas en la lesión hepática experimental y progresión de la enfermedad.

Tecnologías independientes del cultivo han identificado cambios microbianos, metagenómicos y metabolómicos de la microbiota entérica que contribuyen a desarrollar NAFLD y NASH.

Varios estudios recientes reportan cambios cualitativos, *disbiosis*, en el microbioma intestinal asociados con diferentes causas de enfermedad hepática crónica en los seres humanos. Los pacientes con hepatitis crónica o cirrosis descompensada secundaria a infección por hepatitis B muestran un número reducido de Bifidobacterias probióticas y de bacterias productoras de ácido láctico (*Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Weissella*) en las heces, mientras que *Enterococcus faecalis* y Enterobacterias se incrementaron en comparación con los portadores asintomáticos y controles sanos. (405)

No se observaron cambios entre portadores crónicos de hepatitis B con pruebas bioquímicas de función hepática normales y controles sanos, lo que sugiere que la infección por hepatitis B en sí no causa cambios en el microbioma.

Un aumento de Streptococcaceae, Veillonellaceae y enterobacterias con una disminución de Lachnospiraceae caracteriza la microbiota intestinal en la cirrosis. La abundancia relativa de Lachnospiraceae y de la familia Streptococcaceae fue negativa y positiva, respectivamente, relacionado con la puntuación de Child-Pugh en pacientes cirróticos. (406) El microbioma asociado a la mucosa se evaluó en pacientes con cirrosis alcohólica y en los alcohólicos sin enfermedad hepática. Sorprendentemente, no se observaron cambios menores entre los grupos alcohólicos y los controles normales. La abundancia de Bacteroidaceae se redujo en los grupos alcohólicos en comparación con los individuos sanos. (407)

Dado que el microbioma no difiere entre la cirrosis alcohólica o por hepatitis B, la enfermedad hepática debe causar otros factores independientes que juegan un papel más importante en la configuración del microbioma intestinal. Tal condición podría ser la enfermedad hepática en fase terminal en sí, asociada con una motilidad intestinal reducida, hipertensión portal y un menor flujo de bilis. El total de ácidos biliares fecales están reducidos en pacientes con hepatitis crónica o cirrosis descompensada secundaria a la infección por hepatitis B en comparación con los portadores asintomáticos y controles sanos. (405)

Los factores dietéticos son fuertes determinantes de la composición microbiana. Una dieta mantenida a largo plazo se correlaciona con los enterotipos en los seres humanos, en particular proteínas y grasas animales (Bacteroides) frente a los hidratos de carbono (Prevotella). (283)

Por otra parte, el consumo de alcohol y una dieta al estilo occidental son determinantes dietéticos igualmente importantes para la composición del microbioma. La dieta puede ser más importante para determinar la composición microbiana en etapas tempranas de la enfermedad hepática, mientras que las últimas etapas están más influenciadas por las consecuencias de la enfermedad hepática terminal como se mencionó anteriormente.

Cuando se comparó el microbioma intestinal en las primeras etapas de afectación hepática por tóxicos (tetracloruro de carbono), colestasis (ligadura del conducto biliar), alcohol y enfermedad hepática grasa en ratones ob / ob con una mutación en la hormona de la saciedad (leptina), no hubo una única especie bacteriana común que dominara el microbioma asociada con cada una de las cuatro diferentes enfermedades del hígado. (408) La mayoría de los cambios se observaron en los ratones tratados con alcohol, apoyando una vez más la idea de que los factores dietéticos probablemente son más importantes en la formación del microbioma intestinal en las primeras etapas de la enfermedad hepática.

Las diferencias en la composición microbiana asociada con enfermedad hepática no sólo son de carácter cualitativo, también se encuentran diferencias cuantitativas comúnmente en pacientes con enfermedad hepática crónica. Las técnicas tradicionales de cultivo o PCR cuantitativa detectaron *sobrecrecimiento bacteriano intestinal* en el intestino delgado, principalmente en pacientes con enfermedad hepática crónica o cirrosis. (409)

Tradicionalmente, la investigación se ha centrado en una *disfunción de la barrera intestinal* y la translocación bacteriana como una de las principales interacciones entre el intestino y el hígado.

La microflora intestinal es una fuente para varios hepatotoxinas y PAMPs, incluyendo LPS. La interrupción de la barrera mucosa facilita la translocación de estas moléculas desde el lumen intestinal al hígado. El concepto de translocación bacteriana está bien establecido en pacientes con enfermedad hepática terminal y se ha asociado con infecciones como la peritonitis bacteriana espontánea. La permeabilidad intestinal,

según la evaluación de la excreción urinaria de polietilenglicol después de la administración oral, es mayor en pacientes cirróticos que en los controles sanos. (410)

El aumento de la permeabilidad intestinal a menudo implica una interrupción de las uniones estrechas. La expresión de proteínas duodenales de las uniones estrechas, ocludina y claudina-1 es menor en los pacientes con cirrosis que en los controles sanos y se correlaciona inversamente con los niveles de endotoxina sistémicos. (411)

Marcadores plasmáticos de necrosis del enterocito (ácido graso intestinal unido a proteínas), la translocación microbiana (LPS) y la activación de los monocitos (CD14) se incrementan en las personas con infección crónica por hepatitis B o C. Además, el grado de respuesta del huésped a LPS, reflejado mediante el nivel de CD14, se correlaciona con la inflamación hepática (IL-6), lo que permite distinguir a los individuos con fibrosis grave (cirrosis) por asociarse con la progresión de la enfermedad hepática. La activación del sistema inmune del huésped por translocación bacteriana acelera la fibrogénesis y la progresión clínica de la enfermedad hepática viral. (412)

Los mecanismos moleculares que conducen al fracaso y la alteración de la barrera intestinal en las primeras etapas de la enfermedad hepática, son poco conocidos. La **inflamación intestinal** es un factor determinante de la mediación de una disfunción de la barrera intestinal en la enfermedad hepática experimental. Los inflamosomas son complejos multiproteicos citoplasmáticos compuestos por la unión de nucleótidos y proteínas de repetición ricas en leucina (NLRP).

Los inflamosomas son sensores de PAMPs endógenos o exógenos y de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) que estimulan a citoquinas proinflamatorias tales como pro-IL-1 β y pro-IL-18. Consecuente a la translocación microbiana existe una mayor acumulación de productos bacterianos tales como LPS y ADN bacteriano en la vena porta. Estos productos bacterianos estimulan los receptores TLR 4 y TLR9, respectivamente, lo que lleva a una mayor expresión hepática del TNF, que a su vez conduce a la progresión de NAFLD hacia NASH.

En definitiva, la disbiosis puede afectar a la homeostasis intestinal, causando la inflamación intestinal con translocación microbiana posterior y progresión de la enfermedad hepática, pero también hay evidencias de que un sistema inmune de la mucosa comprometido contribuye a la disbiosis y la translocación bacteriana.

Como se ha comentado previamente, el microbioma puede verse afectado por influencias tales como la dieta, las enfermedades, el uso de medicamentos incluidos

antibióticos y el sistema inmune del huésped. Estas complejas interacciones no sólo son guiadas por PAMPs bacterianas, sino también a través de metabolitos tales como la *colina* o los ácidos biliares. La colina, un componente fosfolípido de la membrana celular que juega un papel crucial en el transporte de lípidos en el hígado. (413) La microbiota intestinal está implicada en el metabolismo de la colina mediante la producción de enzimas que catalizan la colina en metilaminas, potencialmente inductoras de inflamación cuando son absorbidas por el hígado. (414)

Por último, destacar que, curiosamente, los niveles de etanol en sangre fueron significativamente mayores en los pacientes con NASH que en los individuos sanos y los pacientes obesos. Los autores especulan que el microbioma intestinal y quizás *Escherichia* contribuyen a la *producción endógena de alcohol*. (415)

1.3.7. MÉTODOS DE ESTUDIO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL.

1.3.7.1. Métodos tradicionales directos.

Tradicionalmente el estudio de la microbiota intestinal se ha abordado fundamentalmente a través del cultivo de los microorganismos y en su identificación mediante pruebas fenotípicas clásicas: morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. El cultivo de la microbiota fecal en medios selectivos y diferenciales es en apariencia el método más simple y directo, sin embargo, no posee una alta fiabilidad debido a la existencia de bacterias no cultivables. El 99% de las bacterias del contenido fecal son anaerobias estrictas y muchas de ellas extremadamente sensibles al oxígeno, lo que obliga a procurar estrictas condiciones reductoras durante el procesado y el cultivo.

El análisis directo mediante recuento microscópico suele ser complementario para controlar la eficacia de la metodología de cultivo. Sin embargo, presenta el inconveniente de que no proporciona información de la diversidad microbiana y los recuentos pueden también infravalorarse si las bacterias tienden a unirse y formar grumos.

1.3.7.2. Métodos tradicionales indirectos.

Consisten básicamente en el estudio del metabolismo bacteriano. El principio se basa en la estimación de la microbiota intestinal mediante el análisis y la cuantificación de sus metabolitos o ciertas actividades enzimáticas. Se pueden estudiar metabolitos como los ácidos grasos volátiles o productos del metabolismo de los ácidos biliares mediante técnicas cromatográficas, o actividades enzimáticas de origen microbiano como las

glicosidas o las reductasas. Estos métodos de estudio presentan el inconveniente de que muchas actividades enzimáticas no son específicas de un microorganismo o de un grupo bacteriano concreto; a lo que hay que añadir la existencia, en ocasiones, de una gran variabilidad o plasticidad metabólica en las especies.

1.3.7.3. Métodos moleculares.

La aplicación de herramientas de genética molecular independientes de cultivo ofrece un gran potencial en la identificación, cuantificación y tipificación de los microorganismos del TGI. **(416) (417) (418)**

Los ácidos nucleicos y las proteínas son macromoléculas comunes a todos los seres vivos que cambian con el tiempo. Por ello, pueden considerarse como cronómetros moleculares o documentos de la historia evolutiva. El 16S ARN ribosómico (ARNr) es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacteriana.

1.3.7.3.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El análisis de la secuencia de fragmentos del gen 16S ARNr de distintos grupos filogenéticos reveló un hecho adicional de gran importancia práctica: la presencia de una o más secuencias características que se denominan oligonucleótidos firma. Se trata de secuencias específicas cortas que aparecen en todos o en la mayor parte de los miembros de un determinado grupo filogenético, y nunca, o sólo raramente, están presentes en otros grupos, incluidos los más próximos. Por ello, los oligonucleótidos firma pueden utilizarse para ubicar a cada bacteria dentro de su propio grupo. **(419)**

El 16S ARNr presenta una serie de características **(Figura 15)**, en base a las cuales fue considerado por Woese como cronómetro molecular definitivo **(420)**:

1. Se trata de una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias actuales. Constituye, por tanto, una diana universal para su identificación.
2. Su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado, de modo que las alteraciones en la secuencia reflejan probablemente cambios aleatorios.
3. Los cambios ocurren de manera suficientemente lenta como para aportar información acerca de todos los procariotas a lo largo de toda la escala evolutiva.

4. El tamaño relativamente largo, 1500 nt, minimiza las fluctuaciones estadísticas.
5. La conservación en estructura secundaria puede servir de ayuda en las comparaciones, aportando una base para el alineamiento preciso.
6. Dado que resulta relativamente fácil secuenciar los fragmentos de 16S ARNr, existen bases de datos amplias en continuo crecimiento.

Una vez determinada la secuencia de nucleótidos y establecidas las comparaciones, será el grado de similitud entre las secuencias de 16S ARNr de dos bacterias lo que indique su relación evolutiva.



Figura 15. Representación del gen 16S ARNr con sus regiones variables (v) y conservadas (c).

La amplificación del 16S ARNr se realiza en un termociclador (aparato que va a mantener la temperatura necesaria en cada una de las etapas que conforman un ciclo), gracias a la reacción en cadena de la polimerasa. Esta técnica fue descrita por primera vez por Saiki y colaboradores y posteriormente perfeccionada por Mullis en el año 1987. (421) Existen distintos tipos de PCR:

1. PCR convencional

Se lleva a cabo en un termociclador estándar y se utiliza para la identificación de microorganismos a partir de muestras clínicas o cultivo. Una vez el producto haya sido amplificado, este deberá secuenciarse en algunos de los sistemas ya conocidos. (422)

2. PCR en tiempo real (PCR-RT)

La PCR-RT ha revolucionado la forma de diagnosticar los patógenos humanos en los laboratorios de microbiología clínica. (423) (424) Este método combina la química de la PCR con la detección de la fluorescencia liberada por el producto amplificado en el mismo recipiente en el que ha tenido lugar la reacción. La detección del producto amplificado en la PCR tiene lugar en pocas horas, por lo que es un método de detección mucho más rápido que la PCR convencional. (425)

La PCR-RT tiene una sensibilidad y especificidad equivalente a la PCR convencional combinada con el Southern blot. Además, como los pasos de amplificación y detección de los ácidos nucleicos son llevados a cabo en el mismo recipiente de reacción, el riesgo de contaminación del posterior análisis es menor comparado con los métodos basados en PCR convencional. La PCR-RT requiere menos pasos y es una técnica más simple para llevar a cabo que la PCR convencional. **(425)**

Existen varios métodos para la detección de los ácidos nucleicos, pero solo describiremos la técnica que usa SYBR Green.

SYBR Green es un fluoróforo (molécula que emite fluorescencia) que actúa como agente intercalante del ADN que sirve para detectar la acumulación de cualquier producto de ADN de doble cadena. Tras la formación del producto de ADN amplificado, numerosas moléculas de este fluoróforo se unen al producto formado y emiten una intensa señal de fluorescencia que es fácilmente detectado por el sistema. **(426)**

1.3.7.4. Metagenómica

En los últimos años, el rápido desarrollo de las técnicas de secuenciación de última generación ha permitido secuenciar un gran número de taxones mediante el gen 16S ARNr de bacterias no cultivables. Estas técnicas evitan el paso previo por procedimientos basados en la clonación y/o cultivo, que antes eran necesarios, con sus sesgos asociados, permitiendo que las comunidades microbianas puedan ser investigadas con una mayor resolución e identificando taxones que son menos abundantes. **(427)**

Trabajos basados en técnicas de alto rendimiento para el estudio de la composición microbiana han usado la tecnología de la pirosecuenciación con el sistema 454 Life Science **(428)** y la secuenciación masiva mediante el sistema Illumina. **(429)**

1.3.8. TRATAMIENTO

Los prebióticos son ingredientes alimenticios no asimilables por nuestro organismo que promueven la proliferación selectiva de bacterias intestinales beneficiosas. **(430)**

Los probióticos **(431)** son un preparado o producto que contiene microorganismos definidos, viables y en número suficiente para modificar la microbiota de un ecosistema del hospedador ejerciendo como consecuencia efectos beneficiosos sobre la salud.

En la actualidad existe en el mercado una importante y variada oferta de productos suplementados con prebióticos y/o probióticos. El principal vehículo de administración

de éstos son los productos lácteos, especialmente las leches fermentadas, aunque se pueden encontrar en muchos otros productos como helados, quesos, embutidos, zumos e incluso bizcochos, chocolate o cereales.

Diferentes autores han cuestionado: a) la eficacia de prebióticos, probióticos o su combinación (simbiótico); b) la eficacia de probióticos compuestos de una sola cepa, de una sola especie o de varias especies, y c) la eficacia de microorganismos aislados del mismo o de otro tipo de hospedero.

La trasplante de microbiota fecal, terapia fecal o microbioterapia fecal consiste en la introducción de heces de un individuo sano en el tracto GI de otro individuo para curar una enfermedad específica, en particular la infección por *Clostridium difficile*.

(432) Existe también evidencia del potencial de la microbioterapia fecal para curar EII y otras enfermedades. **(433) (434)**

2. Hipótesis y Objetivos

2. Hipótesis & Objetivos

2.1. HIPÓTESIS

Está claramente establecida la relación entre hígado graso y síndrome metabólico.

El síndrome metabólico es un conjunto de alteraciones que identifican a los sujetos en riesgo de desarrollar diabetes y/o enfermedades cardiovasculares. Por su parte, la enfermedad hepática grasa no alcohólica se define como un trastorno de causa primaria cuya principal característica es el acúmulo de grasa en el hígado. Dos componentes principales del síndrome metabólico, la glucosa y los triglicéridos, se producen en exceso por el hígado graso. Es el hígado, por tanto, un determinante clave de anormalidades metabólicas. Tanto la prevalencia del síndrome metabólico como de la enfermedad hepática grasa no alcohólica aumenta con la obesidad. Determinados patrones dietéticos como el consumo excesivo de azúcares simples o la inactividad física son factores importantes en ambos trastornos.

El emergente campo de la metabolómica tiene el potencial de proporcionar nuevas herramientas de diagnóstico de enfermedad hepática grasa no alcohólica. OWLiver test está basado en investigación metabolómica y, recientemente desarrollado, aporta información útil para diferenciar a los individuos que presentan esteatosis hepática no complicada de aquellos con esteatohepatitis.

Estudios previos han sugerido que la microbiota juega un papel importante en la patogenia de trastornos hepáticos tales como la encefalopatía hepática y/o la peritonitis bacteriana espontánea.

Por otro lado, existen datos que apoyan el papel de la microbiota intestinal tanto en la regulación de la homeostasis energética como en el desarrollo de trastornos metabólicos tales como la resistencia a la insulina o la diabetes tipo 2.

En base a lo anterior, la hipótesis del presente trabajo es:

Existe una relación entre el patrón inflamatorio hepático (OWLiver Test) en los pacientes con esteatosis hepática y/o síndrome metabólico que pudieran estar en relación con los datos clínicos (patrón dietético, actividad física y composición corporal) y analíticos relacionados con el síndrome metabólico y los diferentes patrones de microbiota.

2.2. OBJETIVOS

El objetivo general de este estudio es profundizar en el conocimiento de los diferentes patrones de inflamación (OWLiver Test), la composición y diversidad de la microbiota intestinal y la presencia de síndrome metabólico. Para ello y tras clasificar a los participantes a estudio en 3 grupos; esto es:

1. Sujetos con síndrome metabólico y enfermedad hepática grasa no alcohólica.
2. Sujetos con síndrome metabólico sin enfermedad hepática grasa no alcohólica.
3. Sujetos con enfermedad hepática grasa no alcohólica sin síndrome metabólico.

Establecemos como objetivos más concretos:

- Describir las características antropométricas de la población global a estudio y establecer las diferencias existentes entre los 3 grupos seleccionados.
- Mostrar las características analíticas relacionadas con la presencia de síndrome metabólico y/o enfermedad hepática grasa no alcohólica en cada colectivo de sujetos evaluados.
- Valorar los resultados de la evaluación clínico-ecográfica del patrón esteato-inflamatorio de cada grupo de individuos estudiados.
- Evaluar los diferentes componentes del síndrome metabólico en cada conjunto de participantes.
- Describir el patrón de adherencia a la dieta mediterránea en cada grupo de individuos descrito.
- Evaluar el patrón de ejercicio físico y sedentarismo en los diferentes colectivos propuestos.
- Estudiar el patrón esteato-inflamatorio hepático evaluado según OWLiver Test en cada uno de los grupos fenotípicos estudiados.
- Evaluar la relación, si existiese, entre la microbiota intestinal y el patrón de inflamación.
- Evaluar la posible asociación de la microbiota intestinal con el patrón de adherencia a la dieta mediterránea, el ejercicio, y la composición corporal.

3. Material y Métodos

3. Material y Métodos

3.1. DISEÑO Y SUJETOS DEL ESTUDIO

3.1.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio observacional transversal para comprobar la relación existente entre el patrón de microbiota intestinal, el grado de esteatosis-inflamación hepática y el síndrome metabólico.

3.1.2. SUJETOS DEL ESTUDIO

Este estudio se lleva a cabo en el Hospital Comarcal de la Axarquía (Vélez Málaga) en un grupo de sujetos que acudieron a realizarse una ecografía abdominal, procedentes tanto del ámbito de atención primaria como especializada, o a revisión en consulta de Medicina Interna. Se reclutan sujetos diagnosticados de hígado graso según los criterios ecográficos habituales con o sin criterios de síndrome metabólico y también aquellos sin hígado graso pero con criterios diagnósticos de síndrome metabólico según IDF 2005. El periodo de estudio incluye los años 2014 y 2015.

Los participantes incluidos son de origen caucásico, tienen entre 18-65 años y fueron debidamente informados, solicitando a todos ellos el consentimiento informado (**Anexo I**) de acuerdo con la normativa del Comité Ético.

Los criterios de exclusión fueron:

- Ingesta alcohólica habitual (más de 3 unidades de bebidas alcohólicas estándar al día en hombres y 2 en mujeres).
- Ingesta en las últimas 4 semanas previas a la toma de muestras de dieta hipocalórica o fármacos que puedan alterar la microbiota: antibióticos, glucocorticoides, inhibidores de la calcineurina, agentes biológicos, tratamiento antineoplásico, solución evacuante, prebióticos, probióticos.
- Haber sido sometidos en las últimas 4 semanas a pruebas diagnósticas con contrastes yodados.
- Hepatopatía no alcohólica secundaria, esto es: hepatopatías virales, enfermedad de Wilson, hepatopatía autoinmune, déficit de alfa1 antitripsina, enfermedad celíaca, fármacos (corticoides, estrógenos, tamoxifeno, amiodarona, diltiazem, sulfasalazina, espironolactona, metrotexato, naproxeno, antirretrovirales),

procedimientos quirúrgicos que conlleven una pérdida de peso intensa, nutrición parenteral total y tirosinemia.

- Enfermedad inflamatoria intestinal o diarrea crónica.
- Antecedentes de neoplasia maligna gastrointestinal o poliposis.

El estudio transversal se realiza en 48 sujetos. Estos sujetos se clasifican en 3 grupos:

- Pacientes con enfermedad hepática grasa no alcohólica (NAFLD) diagnosticados mediante criterios ecográficos habituales y criterios de síndrome metabólico según IDF 2005.
- Pacientes con NAFLD diagnosticados mediante criterios ecográficos habituales sin síndrome metabólico.
- Pacientes sin criterios ecográficos de NAFLD, pero con criterios de síndrome metabólico según IDF 2005.

3.2. VARIABLES DEL ESTUDIO

3.2.1. VARIABLES ANTROPOMÉTRICAS

A todos los sujetos incluidos en el estudio se les mide una serie de variables antropométricas, las cuales se encuentran recogidas en la **Tabla M-1**.

Tabla M-1. Datos clínicos y antropométricos medidos en los sujetos del estudio.

Variable	Unidades
Edad	Años
Talla	m
Índice de masa corporal	Kg/m ²
Cintura	cm
Metabolismo basal	Kcal
Impedancia	Ω
Masa grasa	Kg ; %
Masa magra	Kg
Agua total	Kg
Tensión arterial	mmHg

3.2.2. VARIABLES EN RELACIÓN CON NAFLD

3.2.2.1. Parámetros analíticos

- GOT-AST medido en U/L: Valor normal 8-45
- GPT- ALT medido en U/L: Valor normal 14-62
- GGT medido en U/L: Valor normal 12-78

- Fosfatasa Alcalina medida en U/L: Valor normal 45-117.
- Según el patrón de perfil hepático se clasifica en:
 - Patrón normal
 - Patrón citólisis: Elevación AST/ALT
 - Patrón colestasis: Elevación GGT/FA
 - Patrón mixto de citólisis-colestasis.
- OWLiver test distingue 3 grados de afectación hepática grasa que corresponden a las 3 variables a estudio:
 - No NAFLD: No esteatosis
 - NAFLD: Esteatosis
 - NASH: Esteatohepatitis

3.2.2.2. Parámetros ecográficos

Según los criterios ecográficos habituales, se distinguen 4 grados de intensidad de depósito de grasa en el hígado que corresponden a las 4 variables a estudio:

- No esteatosis
- Esteatosis leve: el hígado es levemente hiperecogénico.
- Esteatosis moderada: el parénquima hepático es más ecogénico y existe una ligera disminución de la visualización de los vasos intrahepáticos.
- Esteatosis severa: la ecogenicidad está muy aumentada, lo que produce un hígado muy brillante, y existe una visualización muy pobre de los vasos intrahepáticos.

3.2.3. VARIABLES EN RELACIÓN CON SM

3.2.3.1. Parámetros analíticos

- Glucemia basal medida en mg/dl: Valor normal 70-110.
- HbA1c medida en %: Valor normal 4-6.
- Insulina basal medida en μ IU/ml: Valor normal 5-25
- Péptido C medido en ng/ml: Valor normal 1.1-4.4
- HDL- Colesterol medido en mg/dl: Valor normal 31-77
- Triglicéridos medidos en mg/dl: Valor normal 30-200

3.2.3.2. Parámetros diagnósticos

Según si cumple o no criterios diagnósticos de SM IDF 2005, se valoran las siguientes variables:

- Glucemia ≥ 100 /dl

- DM establecida
- TA \geq 130/85 mmHg
- HDL-Colesterol (< 40 mg/dl en hombres y < 50 mg/dl en mujeres)
- Triglicéridos >150 mg/dl

3.2.4. VARIABLES EN RELACIÓN CON ADHERENCIA A LA DIETA MEDITERRÁNEA

Para la recogida de las variables de cada paciente se utilizó el cuestionario de adherencia a la dieta mediterránea. (Anexo II)

3.2.5. VARIABLES EN RELACIÓN CON EJERCICIO FÍSICO

Para la recogida de las variables de cada paciente se utilizó el cuestionario IPAQ-FS. (Anexo III)

3.2.6. VARIABLES EN RELACIÓN CON MICROBIOTA INTESTINAL.

Se estima la abundancia relativa (RQ) de 4 filos bacterianos:

- Bacteroidetes
- Firmicutes
- Actinobacterias
- Fusobacterias

3.3. INSTRUMENTACIÓN

3.3.1. OBTENCIÓN DE MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS

Todas las mediciones de talla se realizaron con el mismo tallímetro (*Marca Seca, modelo 713*). Del mismo modo, todas las medidas de composición corporal se realizaron con el mismo impedanciómetro (*Marca Tanita modelo TBF-300*).

3.3.2. OBTENCIÓN DE IMÁGENES ECOGRÁFICAS

Todas las ecografías se realizaron con el mismo ecógrafo (Marca Aloka Modelo Prosound Alpha 6).

3.3.3. OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

3.3.3.1. Muestras de sangre en ayunas

A todos los sujetos se les realiza una extracción de sangre tras un ayuno de 10-12 horas.

3.3.3.2. Muestras de heces

Cada muestra de heces se recogió en un frasco estéril de boca ancha y cierre hermético, evitando la contaminación de la misma con orina, sangre y/o agua.

Se trasladó la muestra al laboratorio en un máximo de 24 hs posteriores a su recogida, conservando hasta ese momento el frasco refrigerado en nevera a 4°C. Una vez en el laboratorio y hasta su posterior análisis, fueron conservadas a – 80°C.

3.3.4. DETERMINACIÓN DE VARIABLES BIOQUÍMICAS

La sangre se centrifuga a 4000 rpm, obteniéndose suero y plasma, los cuales son alicuotados y congelados a – 80°C hasta la realización de los análisis respectivos.

La determinación de la glucosa, colesterol, colesterol- HDL, triglicéridos y ácido úrico se realizan por métodos enzimáticos estándar (Dimension Vista, Siemens Diagnostic Healthcare).

La insulina se mide en suero por radioinmunoensayo (IRMA) (Biosource Europe S.A., Belgica) con una reacción cruzada de proinsulina del 0.3%.

La HbA1c se determina en autoanalizador Cobas Integra 700 (Roche Diagnostics), mediante método inmunturbidimétrico para sangre completa hemolizada anticoagulada y referida al método NGSP utilizado en los estudios.

3.3.5. DETERMINACIÓN DE VARIABLES METABOLÓMICAS

De cada muestra de sangre se destinan 200 µl de suero para realizar OWLiver Test. El envío de las muestras al laboratorio OWL se realiza con hielo seco, para preservar la muestra en todo momento.

Para obtener los metabolitos que forman parte del test OWLiver se realiza una extracción líquido-líquido que consiste en añadir cloroformo/ metanol (2:1) a los sueros junto con una solución salina de cloruro de sodio y agitar en vortex unos segundos. Posteriormente las muestras se incuban durante 1h a -20°C con el fin de favorecer la precipitación de las proteínas. Tras este paso, se evapora la muestra en un concentrador evaporador y a continuación, se reconstituye el extracto seco obtenido en acetonitrilo/isopropanol. Finalmente se centrifuga y se trasfiere el sobrenadante a viales de cromatografía para su inyección en el equipo de cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas.

Para controlar que el proceso ha funcionado correctamente se incluyen dos muestras de control diferentes, que se distribuyen a lo largo del ensayo, conocidas como control de calibración y control de validación. Estas muestras se utilizan para corregir posibles diferencias dentro de un ensayo y/o entre ensayos, y para verificar que el proceso ha sido óptimo.

Análisis UPLC-MS: Separación y detección de metabolitos

Tras la etapa de extracción de los metabolitos del suero, se determina la cantidad de cada metabolito en las muestras mediante sistemas de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas que forman parte de la plataforma metabolómica de OWL. Con esta técnica se realiza una separación de los analitos en una columna cromatográfica y posteriormente se detectan en un espectrómetro de masas de alta resolución, para obtener la masa exacta característica de cada uno de los metabolitos.

La fase móvil consiste una mezcla binaria formada por un disolvente A (H₂O/Acetonitrilo/10mM Formiato Amónico) y un disolvente B (Acetonitrilo/Isopropanol/10mM Formiato Amónico). La columna cromatográfica empelada es una UPLC BEH C18, 2,1x100 mm, 1,7 µm trabajando a un caudal de 0,400 mL/min. La separación cromatográfica se obtiene mediante un gradiente lineal que comienza en 40% de B hasta 100% B, seguido por una etapa de limpieza y un reequilibrado de la columna para prepararla para la siguiente inyección.

El eluyente se introduce en el espectrómetro de masas de alta resolución (Xevo G2 QToF, Waters Corp., Milford, MA) trabajando con ionización por electrospray en modo positivo, con voltajes de capilar y cono de 3200V y 30V, respectivamente. El gas de nebulización se fijó en 1000 L/h y la temperatura de la fuente en 120 °C.

Análisis de datos

Una vez inyectadas las muestras en el espectrómetro de masas se analizan los datos para obtener las áreas de los 44 metabolitos, todos ellos triglicéridos, que forman el test OWLIVER. Se integran las áreas de todos los metabolitos y se comprueba que las muestras de control de calibración y control de validación están dentro de los parámetros de calidad previamente definidos. Tras la determinación semicuantitativa de los 44 metabolitos y junto con el IMC del paciente, se aplica un algoritmo matemático que permite clasificar a los pacientes como hígado no graso, esteatosis o esteatohepatitis.

3.3.6. DETERMINACIÓN DE VARIABLES DEL MICROBIOMA.

La extracción se realizó con el QIAamp DNA Kit Stool Mini Kit Handbook (Qiagen, Hilden, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante a partir de 200 mg de muestra fecal. El ADN fue cuantificado midiendo la absorbancia a 260 nm y la pureza determinada con el ratio A₂₆₀/A₂₈₀, usando un espectrofotómetro Nanodrop spectrophotometer (NANODROP Technologies, Wilmington, DE). Las muestras de ADN se almacenaron a -20°C.

La cuantificación de la composición bacteriana se realizó mediante PCR cuantitativa a tiempo real.

Se utilizaron cebadores específicos (**Tabla M-2**) dirigidos a diferentes géneros bacterianos basados en el ARNr 16S para caracterizar la microbiota fecal. Las PCR se llevaron a cabo en un Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). Cada reacción de PCR contenía 2,5 ng de DNA fecal y 0,92 de cada primer (forward and reverse) a una concentración de 10 nmol/μL usando el PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), en un total de 10 μL. Las condiciones usadas en la reacción fueron: 2 minutos a 50°C para la activación de la UDG (uracil DNA glycosilasa); 2 minutos a 95°C para la activación de la polimerasa, 3 segundos por ciclo a 95°C de desnaturalización y 30 segundos a 60°C para la hibridación/extensión, durante 42 ciclos.

La especificidad de las reacciones de PCR se comprobaron en cada reacción de PCR por una curva de fusión (melting curve) con las siguientes condiciones: 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C, 15 segundos a 95°C y 15 segundos a 60°C.

La abundancia relativa de cada filo se calculó usando la abundancia bacteriana total como referencia para conseguir un valor preciso mediante la fórmula [abundancia relativa = $2^{-(Ct \text{ del filo diana} - Ct \text{ referencia})}$].

Tabla M-2. Cebadores utilizados en PCR-RT

Bacteria	Secuencia de oligonucleotides (5'-3')	Referencia
Bacteroidetes	CATGTGGTTTAATTCGATGAT AGCTGACGACAACCATGCAG	Guo et al, (435)
Firmicutes	ATGTGGTTTAATTCGAAGCA AGCTGACGACAACCATGCAC	Guo et al, (435)
Actinobacteria	CGCGGCCTATCAGCTTGTTG CCGTACTCCCCAGGCGGGG	Stach et al, (436)
Fusobacterias	CCCTTCAGTGCCGCAGT GTCGCAGGATGTCAAGAC	Friswell et al, (437)

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LOS DATOS

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS (versión 11.5 para Windows; SPSS, Chicago, IL).

Para el análisis de los datos se ha realizado en primer lugar un análisis univariante: estudio descriptivo de todas las variables implicadas que nos ha servido tanto para conocer los valores entre las que se mueve cada una de ellas como para descartar los posibles errores que hayamos podido cometer en la toma y/o carga de datos (corrigiéndose en su caso).

Posteriormente, para estudiar las relaciones entre las variables cualitativas usamos la chi-cuadrado. Se han obtenido tablas de contingencia donde se han estudiado las frecuencias/porcentajes en los cruces y obtenido el estadístico chi-cuadrado de Pearson correspondiente.

Por último, para valorar los valores que las variables cuantitativas toman en cada grupo, usamos la prueba de la t-student o el análisis de la varianza de una vía, en caso de encontrar diferencias significativas se realizan las pruebas a posteriori para determinar los pares de grupos que nos dan estas diferencias. En caso que no se cumplan las condiciones de paramétricas, se usan las pruebas no paramétricas Mann-Witney o Kruskal-Wallis, respectivamente.

En todas la pruebas, hemos considerado que se obtienen resultados significativos cuando la $p < 0.05$.

3.5. ASPECTOS ÉTICOS DEL ESTUDIO.

El proyecto se realiza siguiendo las Guías de Buenas Prácticas Clínicas y la Declaración de Helsinki (Fortaleza, Brasil 2013). Se garantiza la confidencialidad de los datos según la Ley Orgánica de Protección de datos de Carácter Personal 15/1999.

Toda la información se ha utilizado únicamente para los fines reseñados.

Los datos que puedan identificar a los participantes se han mantenido de forma separada e identificados por un código.

Todos los investigadores implicados en el proyecto se comprometen a cumplir las normas necesarias para preservar la confidencialidad de la información facilitada por los participantes.

El presente proyecto fue aprobado por el CEI Provincial de Málaga en la sesión del 23/4/15.

4. Resultados

4. Resultados

Los sujetos que constituyeron el estudio se clasificaron de forma basal en 3 diferentes categorías definidas según cumplieran criterios diagnósticos IDF 2005 de SM, hallazgo ecográfico de esteatosis hepática, o ambos.

4.1. VARIABLES ANTROPOMÉTRICAS Y BIOQUÍMICAS

Las diferentes variables antropométricas y bioquímicas medidas en el estudio se presentan en la **Tabla R-1**. En ella se recogen los resultados obtenidos tanto para el total de pacientes como para cada categoría del estudio.

Tabla R-1. Variables antropométricas y bioquímicas basales

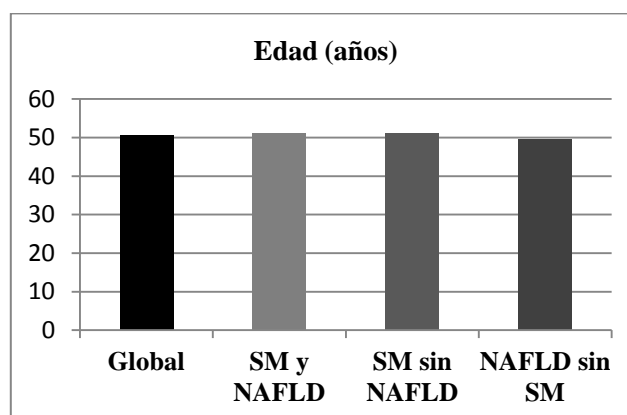
	Global	SM y NAFLD	SM sin NAFLD	NAFLD sin SM
N (hombre/mujer)	48 (24/24)	25 (11/14)	10 (7/3)	13 (6/7)
	\bar{x} σ	\bar{x} σ	\bar{x} σ	\bar{x} σ
Edad (años)	50.6 \pm 8.8	51.0 \pm 9.0	51.1 \pm 9.4	49.5 \pm 8.6
Peso (Kg)	85.8 \pm 15.1	87.1 \pm 17.5	87.6 \pm 9.6	81.9 \pm 13.8
Talla (m)	164.2 \pm 10.5	163.4 \pm 8.28	168.9 \pm 13.7	162.2 \pm 11.6
IMC (Kg/m ²)	31.8 \pm 4.7	32.5 \pm 5.2	31.1 \pm 5.6	31.0 \pm 2.8
Cintura (cm)	101.0 \pm 9.0	102.7 \pm 9.8	100.5 \pm 8.7	98.0 \pm 2.0
Metabolismo basal (Kcal)	1669.2 \pm 278.7	1662.2 \pm 285.4	1742 \pm 247.9	1626.9 \pm 298.1
Impedancia (Ω)	479.4 \pm 62.9	485.0 \pm 61.0	451.9 \pm 50.6	489.6 \pm 72.9
Masa grasa (%)	35.8 \pm 7.8	37.9 \pm 7.6	31.4 \pm 9.0	35.4 \pm 5.8
Masa grasa (Kg)	30.9 \pm 9.6	33.4 \pm 11.3	27.5 \pm 8.3	28.6 \pm 4.8
Masa magra (Kg)	54.9 \pm 10.9	53.6 \pm 10.1	60.17 \pm 10.7	53.2 \pm 12.1
Agua total (Kg)	40.1 \pm 8.0	39.2 \pm 7.4	44.0 \pm 7.8	39.0 \pm 8.8
Glucosa basal (mg/dl)	110.3 \pm 38.4	112.3 \pm 39.2	123.9 \pm 53.4	96.1 \pm 13.9
HbA1c (%)	6.2 \pm 1.6	6.4 \pm 1.3	6.7 \pm 2.6	5.5 \pm 0.5 ^a
Insulina basal (μ IU/ml)	13.6 \pm 8.8	16.1 \pm 10.0	11.3 \pm 8.2	10.4 \pm 4.7
Péptido C (ng/ml)	1.0 \pm 1.4	0.7 \pm 1.1	2.5 \pm 2.1	0.3 \pm 0.2 ^a
Colesterol (mg/dl)	197.5 \pm 39.7	206.8 \pm 40.4	181.0 \pm 46.8	192.4 \pm 29.1
HDL-Colesterol (mg/dl)	48.3 \pm 15.2	46.7 \pm 16.4	39.1 \pm 6.7	58.4 \pm 12.0 ^a
LDL-Colesterol (mg/dl)	116.5 \pm 33.3	125.1 \pm 38.1	100.1 \pm 99	113.7 \pm 22.9
Triglicéridos (mg/dl)	171.8 \pm 123.5	182.0 \pm 90.5	237.9 \pm 207.2	101.3 \pm 44.4 ^a
GOT-AST (U/L)	33.5 \pm 23.7	39.6 \pm 28.4	23.2 \pm 9.3	45 \pm 35.7
GPT-ALT (U/L)	34.9 \pm 23.6	35.0 \pm 21.3	29.2 \pm 10.6	39.3 \pm 33.8
GGT (U/L)	50.9 \pm 92.9	68.0 \pm 126.0	29.6 \pm 15.2	34 \pm 23.5
A.Urico (mg/dl)	5.8 \pm 1.7	5.6 \pm 1.5	6.9 \pm 2.5	5.6 \pm 1.4
PCR (mg/L)	2.9 \pm 1.4	2.8 \pm 1.8	3.3 \pm 0.5	2.7 \pm 1.4

^a P <0.05: diferencias significativas entre los grupos.

4.1.1. Edad

La edad media de la población estudiada fue 50.6 ± 8.8 años. No hubo diferencias significativas respecto a la edad en los sujetos en función de su clasificación en SM y NAFLD (51.0 ± 9.0 años), SM sin NAFLD (51.1 ± 9.4 años) y NAFLD sin SM (49.5 ± 8.6 años). **(Figura R-1).**

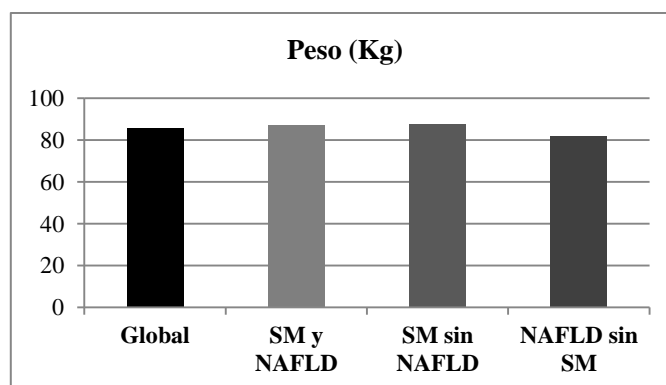
Figura R-1. Edad (años) en el global de pacientes y clasificados según categorías a estudio.



4.1.2. Peso, índice de masa corporal, cintura.

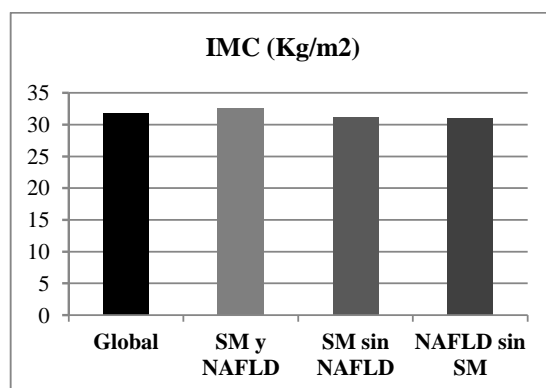
El peso medio de la población fue de 85.8 ± 15.1 Kg. En sujetos SM y NAFLD, el peso medio fue de 87.1 ± 17.5 Kg; en aquellos con SM sin NAFLD fue 87.6 ± 9.6 Kg y en NAFLD sin SM fue 81.9 ± 13.8 Kg. No se hallaron diferencias significativas. **(Figura R-2).**

Figura R-2. Peso (Kg) en el global de pacientes y clasificados según categoría a estudio



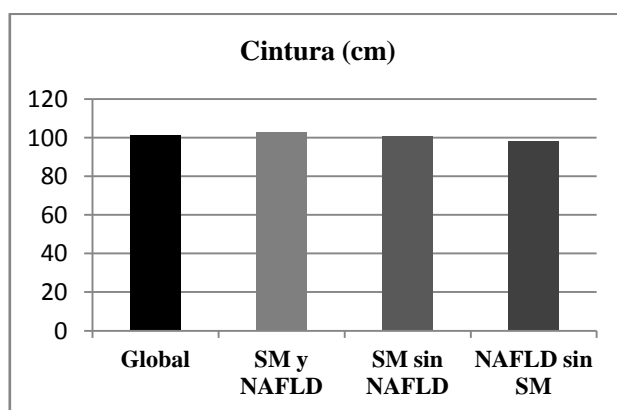
De la misma forma, el IMC medio de la población fue 31.8 ± 4.7 Kg/m²; 32.5 ± 5.2 Kg/m² en sujetos con SM y NAFLD, 31.1 ± 5.6 Kg/m² en sujetos con SM sin NAFLD y 31.0 ± 2.8 Kg/m² en sujetos NAFLD sin SM. Los IMC medio de los grupos no mostraron diferencias significativas. **(Figura R-3).**

Figura R-3. Índice de masa corporal (IMC) (Kg/m²) en el global de pacientes y clasificados según categoría a estudio.



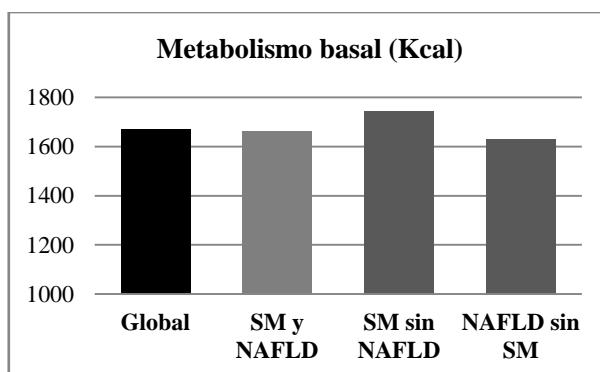
El perímetro medio de la cintura de la población fue de 101.0 ± 9.0 cm. En sujetos SM y NAFLD, el perímetro medio fue de 102.7 ± 9.8 cm; en aquellos con SM sin NAFLD fue 100.5 ± 8.7 cm y en NAFLD sin SM fue 98.0 ± 7.39 cm. No se hallaron diferencias significativas. **(Figura R-4).**

Figura R-4. Perímetro de la cintura (cm) en el global de pacientes y clasificados según categoría a estudio.

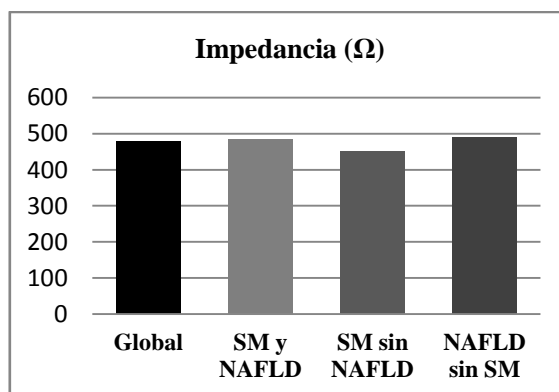


4.1.3. Metabolismo basal, impedancia, masa grasa, masa magra, agua total.

El metabolismo basal medio de la población fue de 1669.2 ± 278.7 Kcal. En sujetos SM y NAFLD, el metabolismo basal medio fue de 1662.2 ± 285.4 Kcal; en aquellos con SM sin NAFLD fue 1742.0 ± 247.9 Kcal y en NAFLD sin SM fue 1626.9 ± 298.1 Kcal. No se hallaron diferencias significativas. **(Figura R-5).**

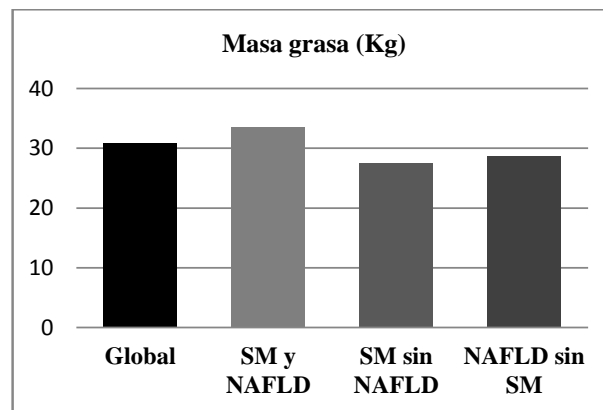
Figura R-5. Metabolismo basal (Kcal) en el global de pacientes y clasificados según categoría a estudio.

El valor medio de impedancia de la población global fue $479.4 \pm 62.9 \Omega$; $485.0 \pm 61.0 \Omega$ en sujetos con SM y NAFLD, $451.9 \pm 50.6 \Omega$ en sujetos con SM sin NAFLD y $489.6 \pm 72.9 \Omega$ en sujetos NAFLD sin SM. El valor medio de impedancia de los grupos no mostró diferencias significativas. (**Figura R-6**).

Figura R-6. Impedancia (Ω) en el global de pacientes y clasificados según categoría a estudio.

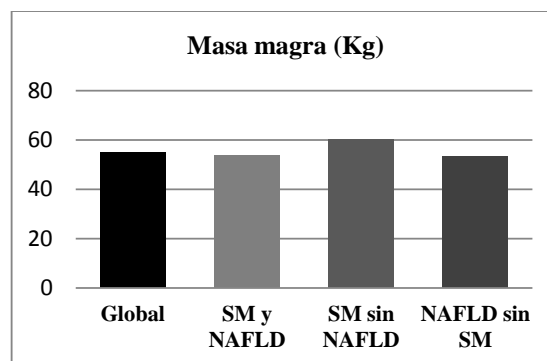
La masa grasa media de la población fue de 30.9 ± 9.6 Kg. En sujetos SM y NAFLD, la masa grasa media fue de 33.4 ± 11.3 Kg; en aquellos con SM sin NAFLD fue 27.5 ± 8.3 Kg y en NAFLD sin SM fue 28.6 ± 4.8 Kg. No se hallaron diferencias significativas. (**Figura R-7**).

Figura R-7. Masa grasa (Kg) en el global de pacientes y clasificados según categoría a estudio.

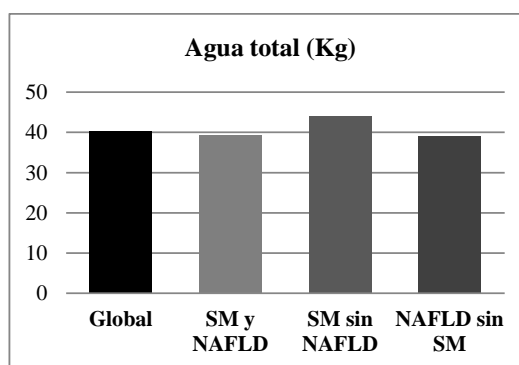


La masa magra media de la población fue de 54.1 ± 10.9 Kg. En sujetos SM y NAFLD, la masa magra media fue de 53.6 ± 10.1 Kg; en aquellos con SM sin NAFLD fue 60.1 ± 10.7 Kg y en NAFLD sin SM fue 53.2 ± 12.1 Kg. No se hallaron diferencias significativas. **(Figura R-8).**

Figura R-8. Masa magra (Kg) en el global de pacientes y clasificados según categoría a estudio.

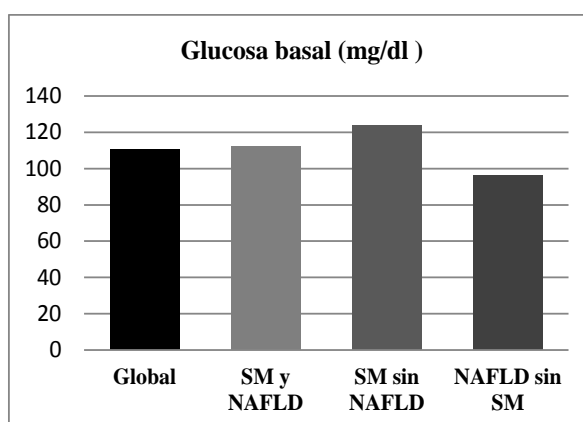


El agua total media de la población fue 40.1 ± 8.0 Kg; 39.2 ± 7.4 Kg en sujetos con SM y NAFLD, 44.0 ± 7.8 Kg en sujetos con SM sin NAFLD y 39.0 ± 8.8 Kg en sujetos NAFLD sin SM. El agua total media de los grupos no mostró diferencias significativas. **(Figura R-9).**

Figura R-9. Agua total (Kg) en el global de pacientes y clasificados según categoría a estudio.

4.1.4. Glucosa basal

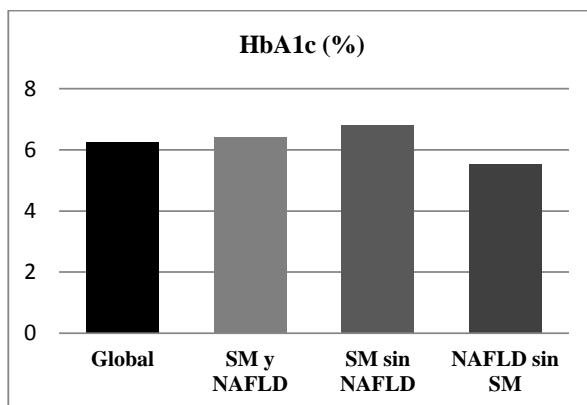
La población global tenía unos niveles medios de glucosa basal de 110.3 ± 38.4 mg/dl. Aquellos con SM y NAFLD presentaron niveles de glucosa basal de 112.3 ± 39.2 mg/dl, los sujetos con SM sin NAFLD 123.9 ± 53.4 mg/dl y los sujetos NAFLD sin SM presentaron niveles de glucosa basal por debajo de 100 mg/dl (96.1 ± 13.9 mg/dl), sin diferencias estadísticamente significativas. (**Figura R-10**).

Figura R-10. Glucosa basal (mg/dl) en el global de pacientes y clasificados según categoría a estudio.

4.1.5. Hemoglobina Glicosilada (HbA1c)

El valor medio de HbA1c de la población fue de $6.2 \pm 1.6\%$. Aquellos con NAFLD sin SM presentaron niveles de HbA1c por debajo del 6% ($5.5 \pm 0.5\%$), significativamente más bajos que el grupo de SM y NAFLD ($6.4 \pm 1.3\%$) y del grupo de SM sin NAFLD ($6.7 \pm 2.6\%$). (**Figura R-11**).

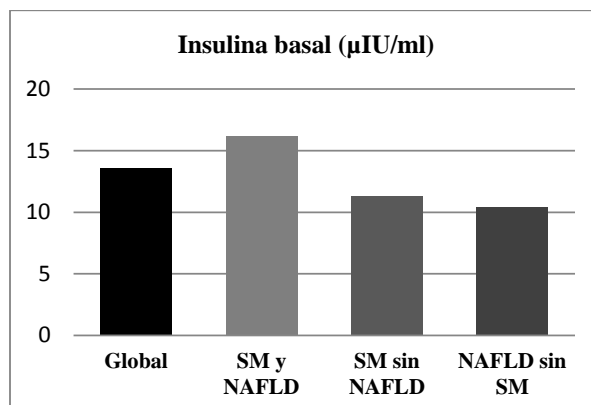
Figura R-11. HbA1c (%) en el global de pacientes y clasificados según categoría a estudio.



4.1.6. Insulina basal.

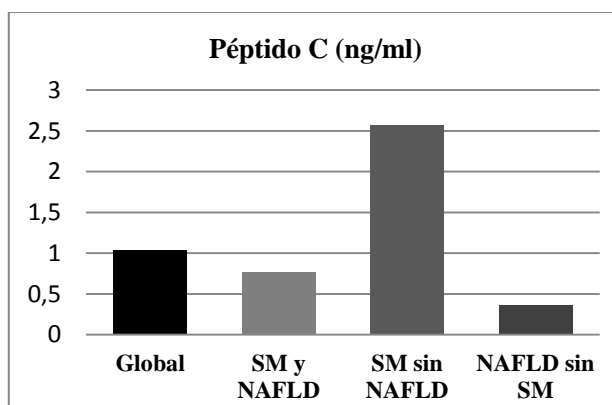
En la población global los niveles medios de insulinemia fueron 13.6 ± 8.8 μ IU/ml. Los valores de insulina más bajos los encontramos en el grupo NAFLD sin SM (10.4 ± 4.7 μ IU/ml), pero sin diferencias significativas respecto al grupo SM y NAFLD (16.1 ± 10.0 μ IU/ml) ni respecto al grupo SM sin NAFLD (11.3 ± 8.2 μ IU/ml). (**Figura R-12**).

Figura R-12. Insulina basal (μ IU/ml) en el global de pacientes y clasificados según categoría a estudio.



4.1.7. Péptido C

El péptido C medio de la población fue de 1.0 ± 1.4 ng/ml. El péptido C significativamente más bajo lo encontramos en sujetos NAFLD sin SM (0.3 ± 0.2 ng/ml), respecto a sujetos SM y NAFLD (0.7 ± 1.1 ng/ml); y sujetos SM sin NAFLD (2.5 ± 2.1 ng/ml). (**Figura R-13**).

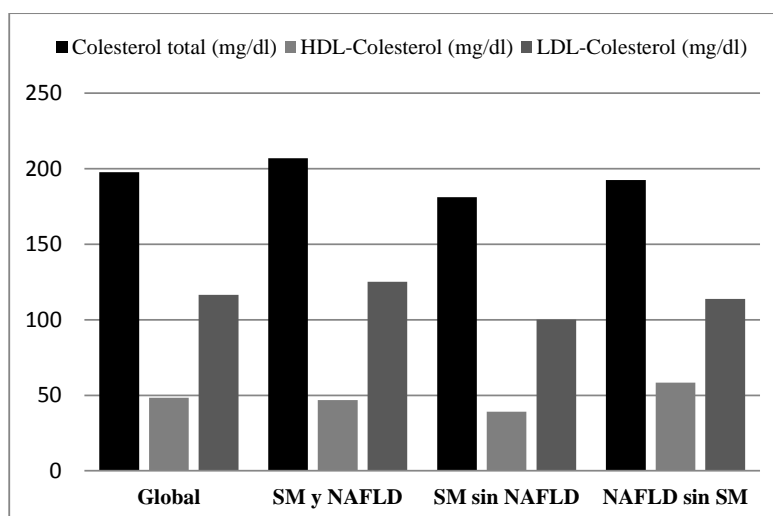
Figura R-13. Péptido C (ng/ml) en el global de pacientes y clasificados según categoría a estudio.

4.1.8. Colesterol

Los niveles medios de colesterol en la población global fueron de 197.5 ± 39.7 mg/dl, sin diferencias entre los sujetos SM y NAFLD (206.8 ± 40.4 mg/dl); SM sin NAFLD (181.0 ± 46.8 mg/dl) y NAFLD sin SM (192.4 ± 29.1 mg/dl). (**Figura R-14**).

Los niveles de HDL-colesterol de la población global fueron 48.3 ± 15.2 mg/dl; siendo los valores del grupo NAFLD sin SM significativamente más altos (58.4 ± 12.0 mg/dl) que los del grupo SM y NAFLD (46.7 ± 16.4 mg/dl) y SM sin NAFLD (39.1 ± 6.7 mg/dl). (**Figura R-14**).

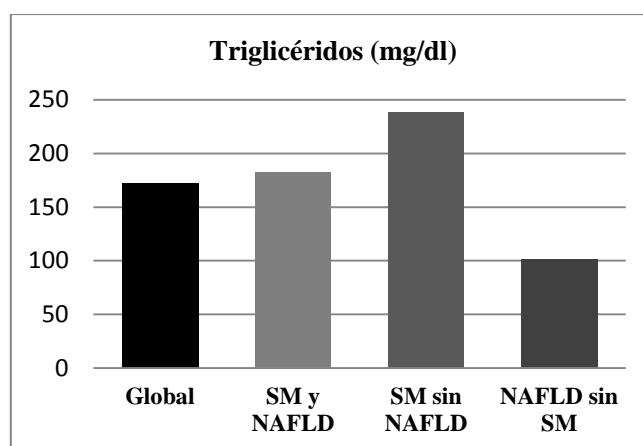
Los niveles LDL-colesterol (Global: 116.5 ± 33.3 mg/dl; SM y NAFLD: 125.1 ± 38.1 mg/dl y SM sin NAFLD: 100.1 ± 28.2 mg/dl) no mostraron diferencias significativas entre los grupos. (**Figura R-14**)

Figura R-14. Niveles de colesterol (mg/dl), HDL-colesterol (mg/dl) y LDL-colesterol (mg/dl) en el global de pacientes y clasificados según categoría a estudio.

4.1.9. Triglicéridos

Los valores medios de triglicéridos en la población global fueron de 171.8 ± 123.5 mg/dl. Los SM sin NAFLD presentan unos niveles significativamente superiores (237.9 ± 207.2 mg/dl) que los SM y NAFLD y NAFLD sin SM (182.0 ± 90.5 mg/dl vs. 101.3 ± 44.4 mg/dl). (**Figura R-15**).

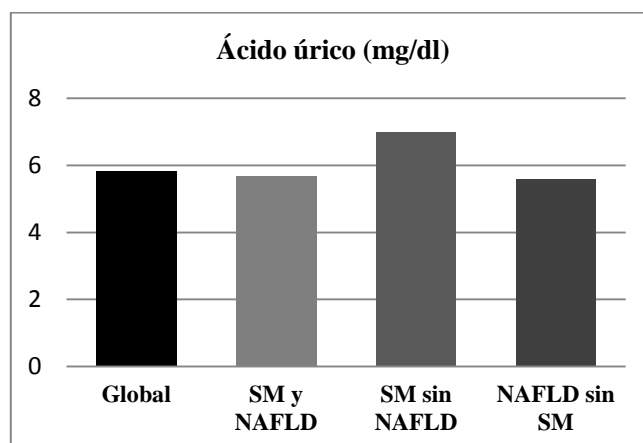
Figura R-15. Triglicéridos (mg/dl) en el global de pacientes y clasificados según categoría a estudio.



4.1.10. Ácido úrico

La media de ácido úrico fue 5.8 ± 1.7 mg/dl, sin diferencias entre grupos (SM y NAFLD: 5.6 ± 1.5 mg/dl; SM sin NAFLD: 6.9 ± 2.5 mg/dl y; NAFLD sin SM: 5.6 ± 1.4 mg/dl). (**Figura R-16**).

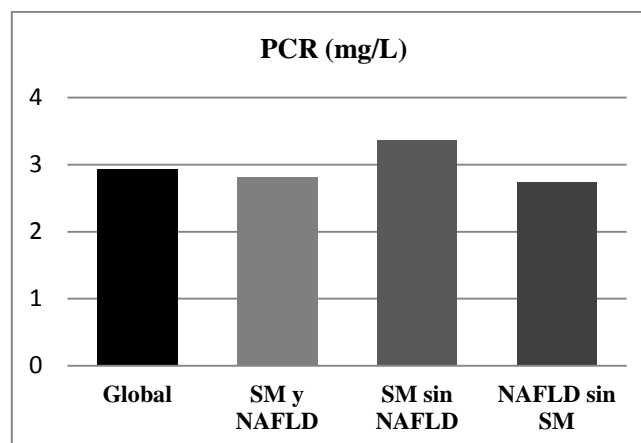
Figura R-16. Ácido úrico (mg/dl) en el global de pacientes y clasificados según categoría a estudio.



4.1.11. Proteína C Reactiva

El valor medio de PCR fue 2.9 ± 1.4 mg/L, sin diferencias entre grupos (SM y NAFLD: 2.8 ± 1.8 mg/L; SM sin NAFLD: 3.3 ± 0.5 mg/L y; NAFLD sin SM: 2.7 ± 1.4 mg/L). (Figura R-17).

Figura R-17. PCR (mg/dl) en el global de pacientes y clasificados según categoría a estudio.



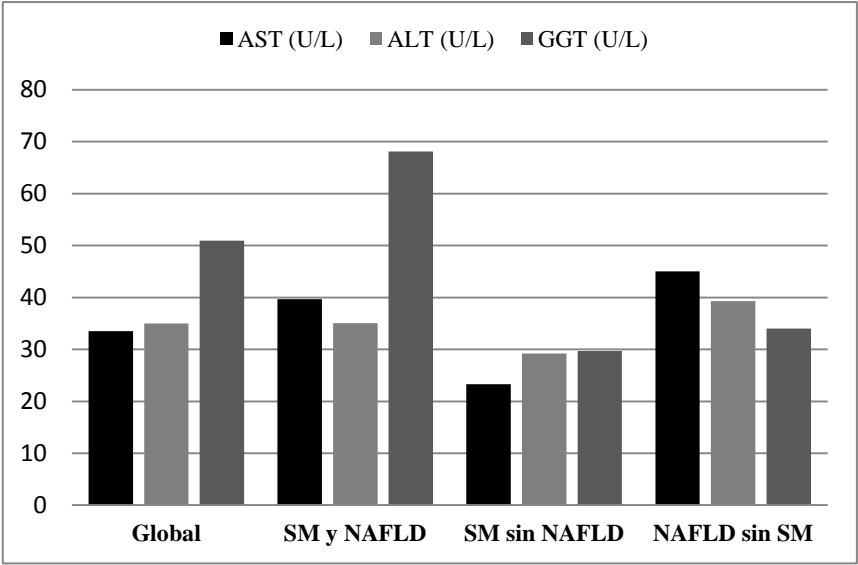
4.1.12. Aspartato aminotransferasa (AST), Alanina aminotransferasa (ALT), Gamma-glutamil transpeptidasa (GGT)

Los niveles medios de AST en la población global fueron de 33.5 ± 23.7 U/L, sin diferencias entre los sujetos SM y NAFLD (39.6 ± 28.4 U/L); SM sin NAFLD (23.2 ± 49.3 U/L) y NAFLD sin SM (45 ± 35.7 U/L). (Figura R-18).

Los niveles medios de ALT de la población global fueron 34.9 ± 23.6 U/L; los del grupo SM y NAFLD (35.0 ± 21.3 U/L); los del grupo SM sin NAFLD (29.2 ± 10.6 mg/dl) y los del grupo NAFLD sin SM (39.3 ± 33.8 mg/dl). No hubo diferencias significativas. (Figura R-18).

Los niveles medios de GGT de la población fueron 50.9 ± 92.9 U/L; 68.0 ± 126.0 U/L en sujetos con SM y NAFLD, 29.6 ± 15.2 U/L en sujetos con SM sin NAFLD y 34.0 ± 23.5 U/L en sujetos NAFLD sin SM. El valor medio de GGT de los grupos no mostró diferencias significativas. (Figura R-18).

Figura R-18. Niveles de AST (U/L), ALT (U/L) y GGT (U/L) en el global de pacientes y clasificados según categoría a estudio.



4.2. VARIABLES EN RELACIÓN CON NAFLD

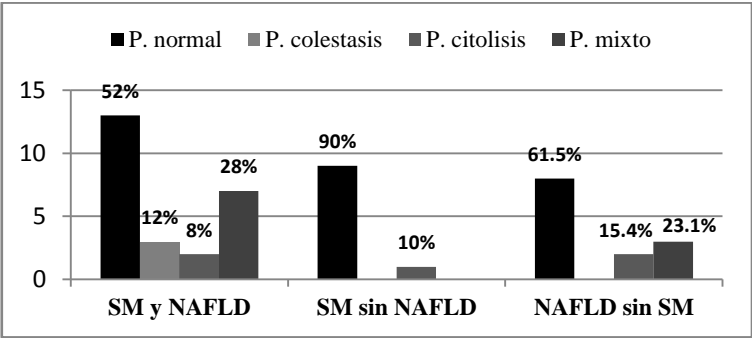
4.2.1. Patrón de transaminasas.

Si valoramos las concentraciones plasmáticas de las enzimas hepáticas en función del patrón de comportamiento (normal, colestasis, citolisis o mixto), observamos que no existen diferencias significativas entre los grupos (**Tabla R-2**) (**Figura R-19**).

Tabla R-2. Patrón de transaminasas en el global de pacientes y clasificados según categoría a estudio.

	Global		SM y NAFLD		SM sin NAFLD		NAFLD sin SM	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Patrón normal	30	62.5	13	52	9	90	8	61.5
Patrón colestasis	3	6.3	3	12	0	0	0	0
Patrón citolisis	5	10.4	2	8	1	10	2	15.4
Patrón mixto	10	20.8	7	28	0	0	3	23.1

Figura R-19. Número de pacientes (N y %) según patrón de transaminasas, clasificados según categoría a estudio.



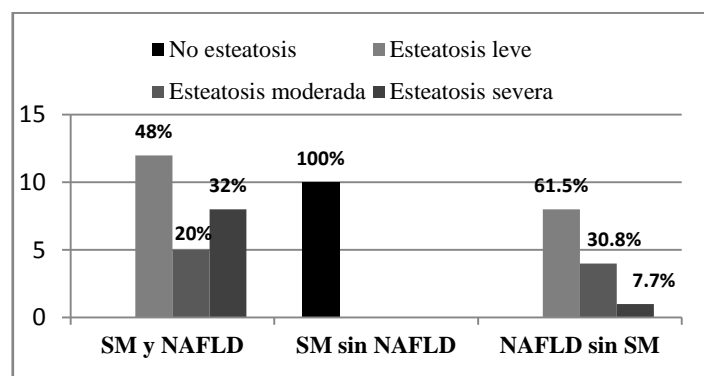
4.2.2. Ecografía de abdomen

Si valoramos los hallazgos ecográficos en función del patrón de severidad (no esteatosis, esteatosis leve, esteatosis moderada o esteatosis grave), observamos que la presencia de esteatosis severa es más frecuente en el grupo SM y NAFLD respecto al grupo NAFLD sin SM; del mismo modo, la esteatosis leve es más frecuente en el grupo NAFLD sin SM que en el grupo SM y NAFLD, pero no existen diferencias estadísticamente significativas. (Tabla R-3) (Figura R-20).

Tabla R-3. Patrón de severidad ecográfico en el global de pacientes y clasificados según categoría a estudio.

	Global		SM y NAFLD		SM sin NAFLD		NAFLD sin SM	
	N	%	N	%	N	%	N	%
No esteatosis	10	20.8	0	0	10	100	0	0
Esteatosis leve	20	41.7	12	48	0	0	8	61.5
Esteatosis moderada	9	18.8	5	20	0	0	4	30.8
Esteatosis severa	9	18.8	8	32	0	0	1	7.7

Figura R-20. Número de pacientes (N y %) según patrón de severidad ecográfico, clasificados según categoría a estudio.



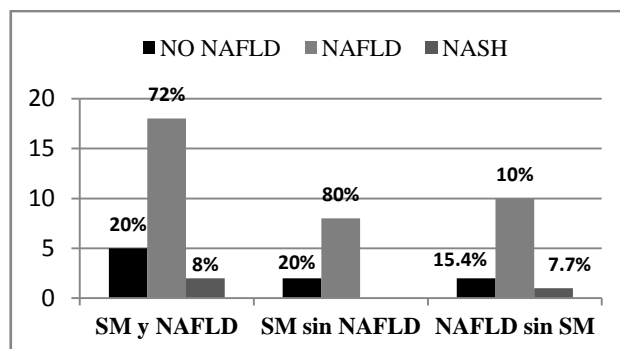
4.2.3. OWLIiver Test

Si valoramos los hallazgos de OWLIiver Test en función del patrón de severidad (NAFLD, NO NAFLD o NASH), observamos que no existen diferencias significativas entre los grupos (Tabla R-4) (Figura R-21).

Tabla R-4. Patrón de severidad OWLIiver Test en el global de pacientes y clasificados según categoría a estudio.

	Global		SM y NAFLD		SM sin NAFLD		NAFLD sin SM	
	N	%	N	%	N	%	N	%
NO NAFLD	9	18.8	5	20	2	20	2	15.4
NAFLD	36	75	18	72	8	80	10	76.9
NASH	3	6.3	2	8	0	0	1	7.7

Figura R-21. Número de pacientes (N y %) según patrón de severidad OWLiver Test, clasificados según categoría a estudio.



4.3. VARIABLES EN RELACIÓN CON SÍNDROME METABÓLICO.

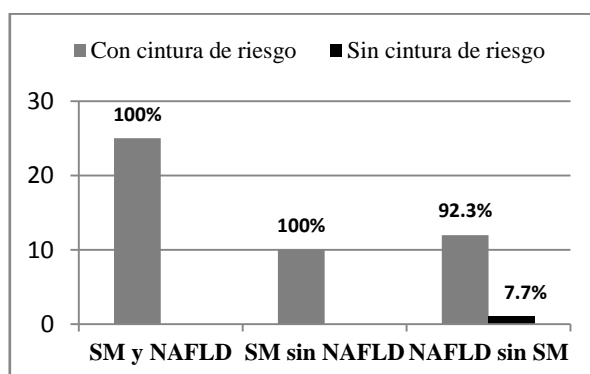
4.3.1. Perímetro de la cintura

Si valoramos los hallazgos del perímetro de la cintura en función del patrón de riesgo para SM de la IDF 2005 (≥ 94 cm en hombres y ≥ 80 cm en mujeres), observamos que no existen diferencias significativas entre los grupos, existiendo un 97.9% del global de la población con cintura de riesgo. (**Tabla R-5**) (**Figura R-22**).

Tabla R-5. Patrón de riesgo de SM según perímetro de la cintura en el global de pacientes y clasificados según categoría a estudio.

	Global		SM y NAFLD		SM sin NAFLD		NAFLD sin SM	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Con cintura de riesgo	47	97.9	25	100	10	100	12	92.3
Sin cintura de riesgo	1	2.1	0	0	0	0	1	7.7

Figura R-22. Número de pacientes (N y %) según patrón de riesgo por perímetro de la cintura, clasificados según categoría a estudio.



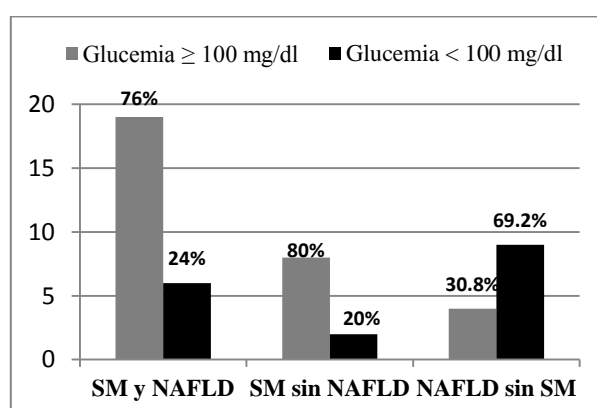
4.3.2. Hiperglucemia y/o Diabetes Mellitus tipo 2

Si valoramos los hallazgos de glucemia basal elevada en función del patrón de riesgo para SM de la IDF 2005 (≥ 100 mg/dl), observamos que la presencia de glucemia basal ≥ 100 mg/dl es más frecuente en el grupo SM sin NAFLD respecto a los grupos NAFLD sin SM y SM y NAFLD. Del mismo modo, la presencia de glucemia basal < 100 mg/dl es más frecuente en el grupo NAFLD sin SM que en los grupos SM y NAFLD y SM sin NAFLD. No se alcanzó significación estadística (**Tabla R-6**) (**Figura R-23**).

Tabla R-6. Patrón de riesgo de SM según glucemia basal > 100 mg/dl en el global de pacientes y clasificados según categoría a estudio.

	Global		SM y NAFLD		SM sin NAFLD		NAFLD sin SM	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Glucemia ≥ 100 mg/dl	31	64.6	19	76	8	80	4	30.8
Glucemia < 100 mg/dl	17	35.4	6	24	2	20	9	69.2

Figura R-23. Número de pacientes (N y %) según patrón de riesgo por glucemia basal > 100 mg/dl, clasificados según categoría a estudio.



Si valoramos la presencia de DM establecida, no se observan diferencias significativas en los grupos (**Tabla R-7**) (**Figura R-24**). Del mismo modo, la medicación pautaada en diabéticos (metformina, insulina u otros antidiabéticos) no muestra diferencias significativas entre grupos. (**Tabla R-8**) (**Figura R-25**)

Tabla R-7. Patrón de riesgo de SM según DM establecida, en el global de pacientes y clasificados según categoría a estudio.

	Global		SM y NAFLD		SM sin NAFLD		NAFLD sin SM	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Con DM establecida	14	29.2	9	36	4	40	1	7.7
Sin DM establecida	34	70.8	16	64	6	60	12	92.3

Figura R-24. Número de pacientes (N y %) según patrón de riesgo por DM establecida, clasificados según categoría a estudio.

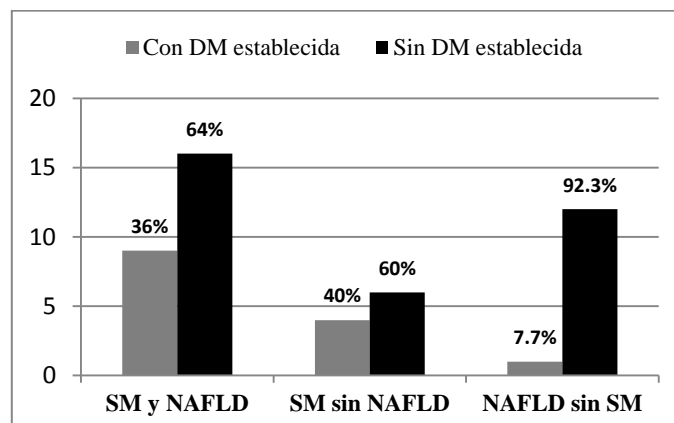
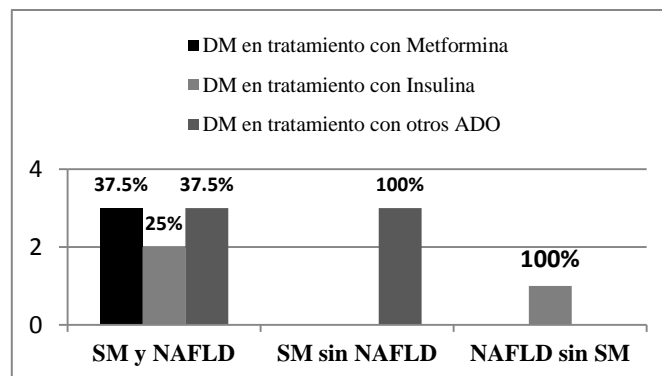


Tabla R-8. Patrón de riesgo de SM según tratamiento para DM, en el global de pacientes y clasificados según categoría a estudio.

	Global		SM y NAFLD		SM sin NAFLD		NAFLD sin SM	
	N	%	N	%	N	%	N	%
DM en tratamiento con Metformina	3	25	3	37.5	0	0	0	0
DM en tratamiento con Insulina	3	25	2	25	0	0	1	100
DM en tratamiento con otros antidiabéticos	6	50	3	37.5	3	100	0	0

Figura R-25. Número de pacientes (N y %) según patrón de riesgo por tratamiento para DM, clasificados según categoría a estudio.

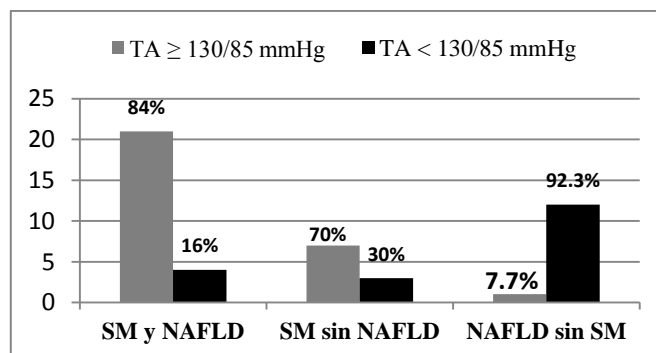


4.3.3. Hipertensión arterial

Si valoramos los hallazgos de tensión arterial (TA) en función del patrón de riesgo para SM de la IDF 2005 ($\geq 130/85$ mmHg), observamos que la presencia de TA $\geq 130/85$ mmHg es significativamente más frecuente en el grupo SM y NAFLD respecto a los grupos NAFLD sin SM y SM sin NAFLD; del mismo modo, la presencia de TA $< 130/85$ mmHg es significativamente más frecuente en el grupo NAFLD sin SM que en los grupos SM y NAFLD y SM sin NAFLD. (Tabla R-9) (Figura R-26).

Tabla R-9. Patrón de riesgo de SM según HTA en el global de pacientes y clasificados según categoría a estudio.

	Global		SM y NAFLD		SM sin NAFLD		NAFLD sin SM	
	N	%	N	%	N	%	N	%
TA \geq 130/85 mmHg	29	60.4	21	84 ^a	7	70	1	7.7
TA < 130/85 mmHg	19	39.6	4	16	3	30	12	92.3 ^a

^a P < 0.05: hay correlación entre las variables**Figura R-26.** Número de pacientes (N y %) según patrón de riesgo por HTA, clasificados según categoría a estudio.

4.3.4. HDL- Colesterol

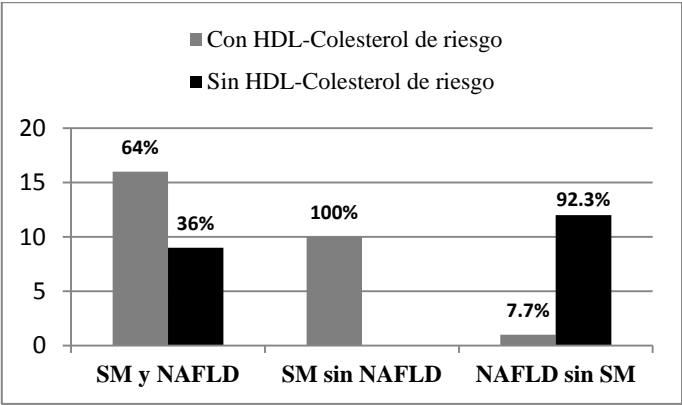
Si valoramos los hallazgos de HDL-Colesterol en función del patrón de riesgo para SM de la IDF 2005 (< 40 mg/dl en hombres y < 50 mg/dl en mujeres), observamos que la presencia de HDL-Colesterol < 40 mg/dl en hombres y < 50 mg/dl en mujeres es significativamente más frecuente en el grupo SM sin NAFLD respecto a los grupos SM y NAFLD y NAFLD sin SM y; del mismo modo, la presencia de HDL-Colesterol > 40 mg/dl en hombres y > 50 mg/dl en mujeres es significativamente más frecuente en el grupo NAFLD sin SM que en los grupos SM y NAFLD y SM sin NAFLD. (**Tabla R-10**) (**Figura R-27**).

Tabla R-10. Patrón de riesgo de SM según HDL-colesterol en el global de pacientes y clasificados según categoría a estudio.

	Global		SM y NAFLD		SM sin NAFLD		NAFLD sin SM	
	N	%	N	%	N	%	N	%
HDL-Colesterol < 40 mg/dl en hombres < 50 mg/dl en mujeres	27	56.3	16	64	10	100 ^a	1	7.7
HDL-Colesterol > 40 mg/dl en hombres > 50 mg/dl en mujeres	21	43.8	9	36	0	0	12	92.3 ^a

^a P < 0.05: hay correlación entre las variables.

Figura R-27. Número de pacientes (N y %) según patrón de riesgo por HDL-Colesterol, clasificados según categoría a estudio.

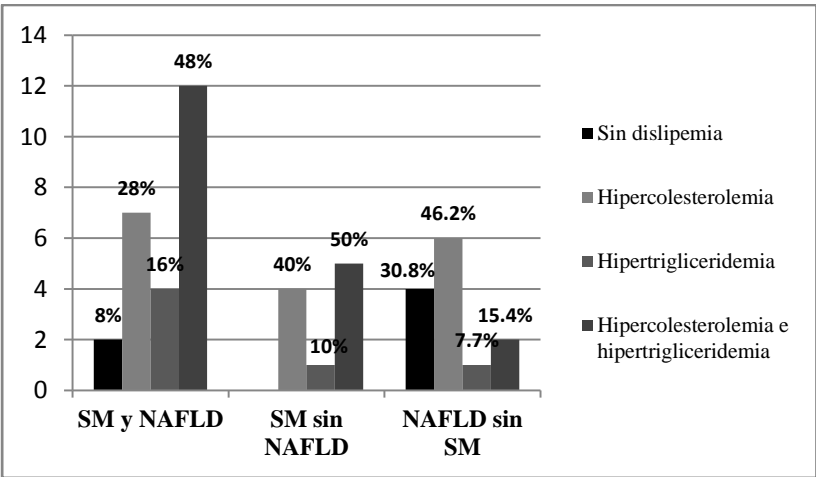


Por otra parte, si valoramos el tipo de dislipemia del sujeto (No dislipemia, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia o hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia) no se observan diferencias significativas en los grupos (**Tabla R-11**) (**Figura R-28**).

Tabla R-11. Patrón de riesgo de SM según tipo de dislipemia en el global de pacientes y clasificados según categoría a estudio.

	Global		SM y NAFLD		SM sin NAFLD		NAFLD sin SM	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Sin dislipemia	6	12.5	2	8	0	0	4	30.8
Hipercolesterolemia	17	35.4	7	28	4	40	6	46.2
Hipertrigliceridemia	6	12.5	4	16	1	10	1	7.7
Hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia	19	39.6	12	48	5	50	2	15.4

Figura R-28. Número de pacientes (N y %) según patrón de riesgo por tipo de dislipemia, clasificados según categoría a estudio.



4.3.5. Triglicéridos

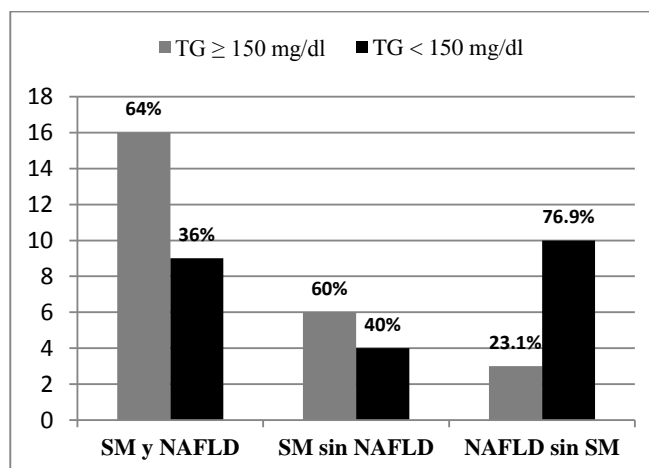
Si valoramos los hallazgos de las cifras de triglicéridos (TG) en función del patrón de riesgo para SM de la IDF 2005 (≥ 150 mg/dl), observamos que la presencia de TG ≥ 150 mg/dl es significativamente más frecuente en el grupo SM y NAFLD respecto a los grupos NAFLD sin SM y SM sin NAFLD; del mismo modo, la presencia de TG < 150 mg/dl es significativamente más frecuente en el grupo NAFLD sin SM que en los grupos SM y NAFLD y SM sin NAFLD. (Tabla R-12) (Figura R-29).

Tabla R-12. Patrón de riesgo de SM según TG en el global de pacientes y clasificados según categoría a estudio.

	Global		SM y NAFLD		SM sin NAFLD		NAFLD sin SM	
	N	%	N	%	N	%	N	%
TG ≥ 150 mg/dl	25	52.1	16	64 ^a	6	60	3	23.1
TG < 150 mg/dl	23	47.9	9	36	4	40	10	76.9 ^a

^a P < 0.05: hay correlación entre las variables.

Figura R-29. Número de pacientes (N y %) según patrón de riesgo por TG, clasificados según categoría a estudio.



4.3.6. Número de factores de riesgo de SM

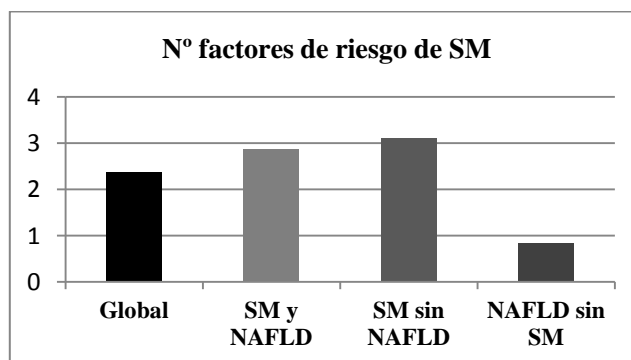
El valor medio del número de factores de riesgo de SM fue 2.37 ± 1.14 factores, con un número de factores de riesgo significativamente mayor en SM sin NAFLD 3.1 ± 0.5 factores, respecto a SM y NAFLD: 2.8 ± 0.7 factores y NAFLD sin SM: 0.8 ± 0.3 factores. (Tabla R-13) (Figura R-30).

Tabla R-13. N° de factores de riesgo de SM en el global de pacientes y clasificados según categoría a estudio.

	Global		SM y NAFLD		SM sin NAFLD		NAFLD sin SM	
	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ
N° factores de riesgo de SM	2.3 ± 1.1		2.8 ± 0.7		3.1 ± 0.5 ^a		0.8 ± 0.3	

^a P < 0.05: diferencias significativas entre los grupos.

Figura R-30. N° de factores de riesgo de SM en el global de pacientes y clasificados según categoría a estudio.



4.4. VARIABLES EN RELACIÓN CON LA ADHERENCIA A LA DIETA MEDITERRÁNEA.

Los diferentes ítems recogidos dentro del cuestionario de adherencia a la DME se presentan en la **Tabla R-14**, con resultados del global y de cada categoría a estudio.

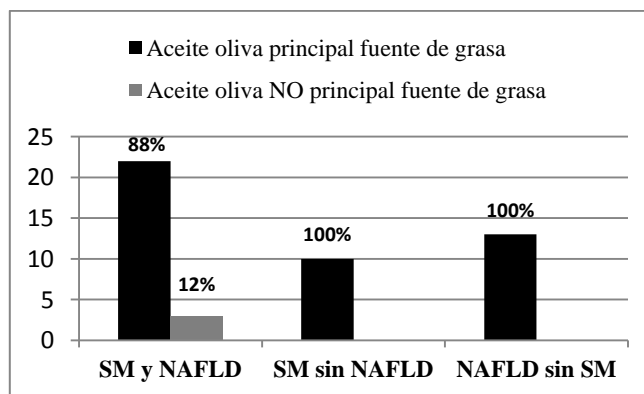
Tabla R-14. Variables en relación con la adherencia a la DME

	Global		SM y NAFLD		SM sin NAFLD		NAFLD sin SM	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Aceite oliva principal fuente de grasa	45	93.8	22	88	10	100	13	100
≥ 2 cucharadas aceite/día	42	87.5	22	88	9	90	11	84.6
≥ 2 raciones verduras/día	18	37.5	12	48	4	40	2	15.4
≥ 3 piezas fruta/día	23	47.9	12	48	5	50	6	46.2
< 1 ración carne roja/día	40	83.3	20	80	10	100	10	76.9
< 1 ración mantequilla/día	40	83.3	21	84	9	90	10	76.9
< 1 bebida carbonatada/día	31	64.6	17	68	8	80	6	46.2
≥ 3 vasos vino/semana	14	29.2	2	8	3	30	2	15.4
≥ 3 raciones legumbres/semana	15	31.3	8	32	1	10	6	46.2
≥ 3 raciones pescado/semana	23	47.9	11	44	6	60	6	46.2
< 3 unidades repostería/semana	27	56.3	15	60	8	80 ^a	4	30.8
≥ 1 ración frutos secos/semana	23	47.9	12	48	4	40	7	53.8
Carnes magras	40	83.3	19	76	10	100	11	84.6
≥ 2 raciones pasta/semana	34	70.8	20	80	6	60	8	61.5
	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ
Puntuación de adherencia DME	8.4 ± 2.0		8.4 ± 1.7		9.2 ± 1.4		7.8 ± 2.7	

4.1. Aceite de oliva

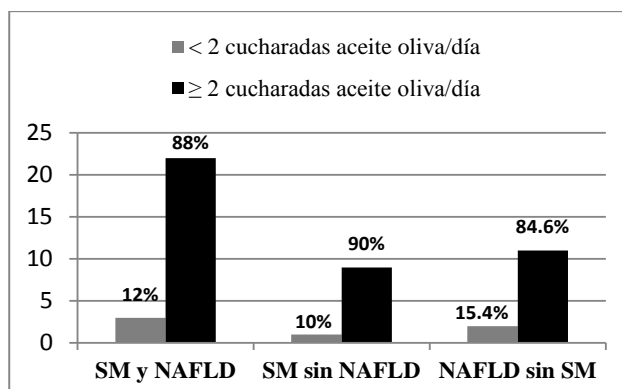
Si valoramos el consumo de aceite de oliva en función de la adherencia o no adherencia al patrón de recomendación de la DME (principal fuente de grasa de la ingesta), observamos que no existe diferencia significativa entre los grupos. (**Figura R-31**).

Tabla R-31. Número de pacientes (N y %) según patrón de adherencia al aceite de oliva como principal fuente de grasa, clasificados según categoría a estudio.



De igual forma, si valoramos el consumo de aceite de oliva en función de la adherencia o no adherencia al patrón de recomendación de la DME (≥ 2 cucharadas de aceite de oliva al día), observamos que no existe diferencia significativa entre los grupos. (**Figura R-32**).

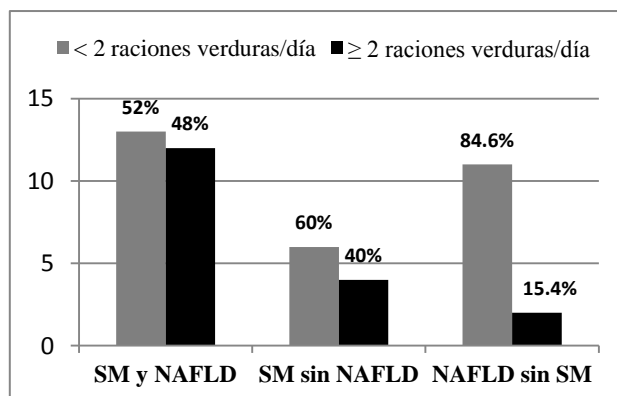
Figura R-32. Número de pacientes (N y %) según patrón de adherencia al consumo diario de ≥ 2 cucharadas de aceite de oliva, clasificados según categoría a estudio.



4.4.2. Verduras u hortalizas

Si valoramos el consumo de verduras u hortalizas en función de la adherencia o no adherencia al patrón de recomendación de la DME (≥ 2 raciones de 200 gr/día), observamos que no existe diferencia significativa entre los grupos. (**Figura R-33**).

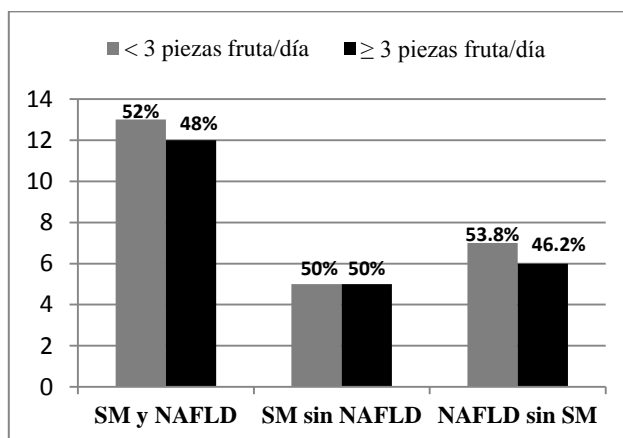
Figura R-33. Número de pacientes (N y %) según patrón de adherencia al consumo diario de ≥ 2 raciones de verduras, clasificados según categoría a estudio.



4.4.3. Fruta

Si valoramos el consumo de fruta en función de la adherencia o no adherencia al patrón de recomendación de la DME (≥ 3 piezas de fruta/día), observamos que no existe diferencia significativa entre los grupos. **(Figura R-34).**

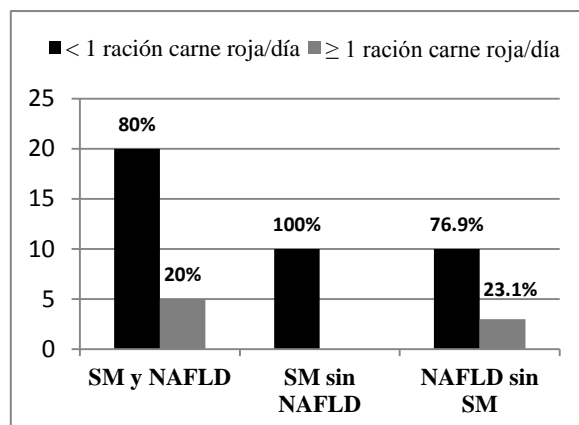
Figura R-34. Número de pacientes (N y %) según patrón de adherencia al consumo diario de ≥ 3 piezas de fruta, clasificados según categoría a estudio.



4.4.4. Carnes rojas, hamburguesas, salchichas o embutidos

Si valoramos el consumo de carnes rojas, hamburguesas, embutidos, salchichas o embutidos en función de la adherencia o no adherencia al patrón de recomendación de la DME (< 1 ración 100-150 g/día), observamos que no existe diferencia significativa entre los grupos. **(Figura R-35).**

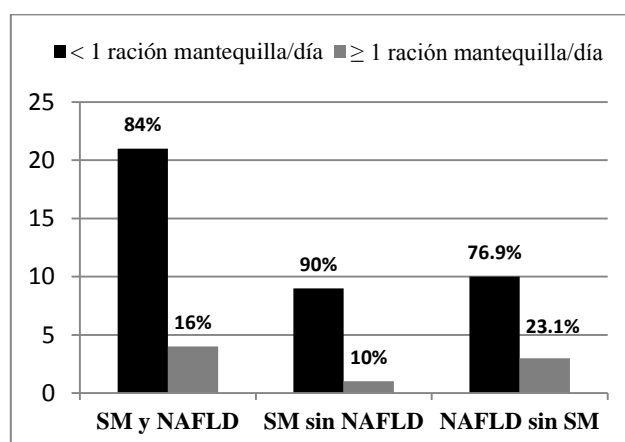
Figura R-35. Número de pacientes (N y %) según patrón de adherencia al consumo diario de < 1 ración de carne roja, clasificados según categoría a estudio.



4.4.5. Mantequilla, margarina o nata

Si valoramos el consumo de mantequilla, margarina o nata en función de la adherencia o no adherencia al patrón de recomendación de la DME (< 1 porción de 12 g/día), observamos que no existe diferencia significativa entre los grupos. (**Figura R-36**).

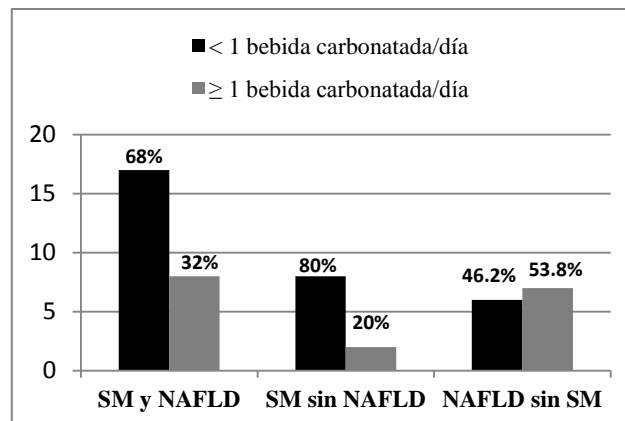
Figura R-36. Número de pacientes (N y %) según patrón de adherencia al consumo diario de < 1 porción de mantequilla, clasificados según categoría a estudio.



4.4.6. Bebidas carbonatadas y/o azucaradas

Si valoramos el consumo de bebidas carbonatadas y/o azucaradas en función de la adherencia o no adherencia al patrón de recomendación de la DME (< 1 UBE/día), observamos que no existe diferencia significativa entre los grupos. (**Figura R-37**).

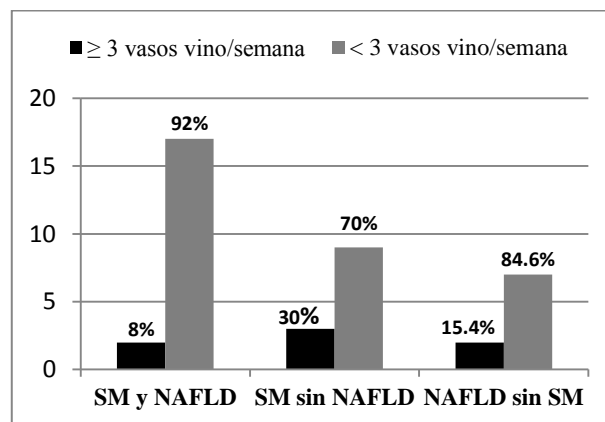
Figura R-37. Número de pacientes (N y %) según patrón de adherencia al consumo diario de < 1 UBE de bebida carbonatada, clasificados según categoría a estudio.



4.4.7. Vino

Si valoramos el consumo vino en función de la adherencia o no adherencia al patrón de recomendación de la DME (≥ 3 vasos/semana), observamos que no existe diferencia significativa entre los grupos. **(Figura R-38).**

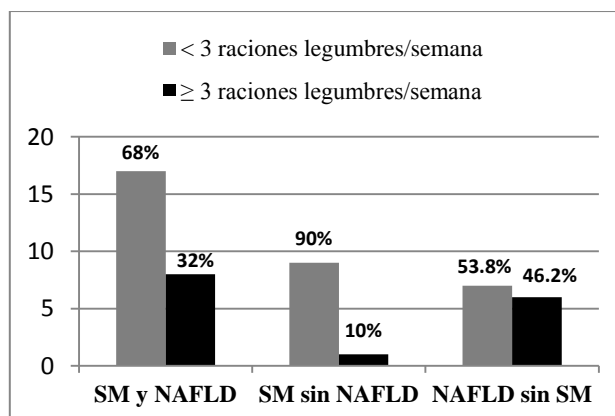
Figura R-38. Número de pacientes (N y %) según patrón de adherencia al consumo semanal de ≥ 3 vasos de vino, clasificados según categoría a estudio.



4.4.8. Legumbres

Si valoramos el consumo de legumbres en función de la adherencia o no adherencia al patrón de recomendación de la DME (≥ 3 raciones de 150 g/semana), observamos que no existe diferencia significativa entre los grupos. **(Figura R-39).**

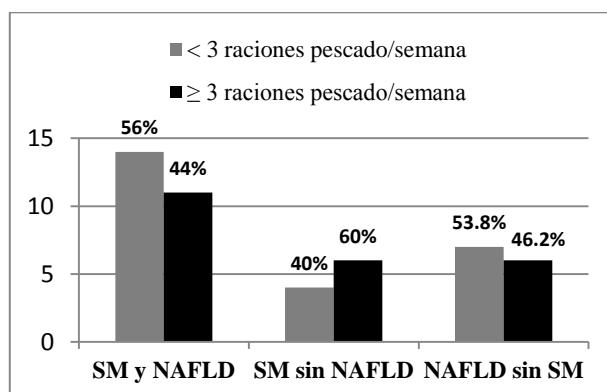
Figura R-39. Número de pacientes (N y %) según patrón de adherencia al consumo semanal de ≥ 3 raciones de legumbres de 150 g, clasificados según categoría a estudio.



4.4.9. Pescados y mariscos

Si valoramos el consumo de pescados y mariscos en función de la adherencia o no adherencia al patrón de recomendación de la DME (≥ 3 o más platos, piezas o raciones/semana. Se considera plato, pieza o ración = 100-150 g de pescado o 4-5 piezas o 200 g de marisco), observamos que no existe diferencia significativa entre los grupos. (Figura R-40).

Figura R-40. Número de pacientes (N y %) según patrón de adherencia al consumo semanal de ≥ 3 platos, piezas o raciones de pescado/marisco de 150 g vs 4-5 piezas vs 200 gr, clasificados según categoría a estudio.

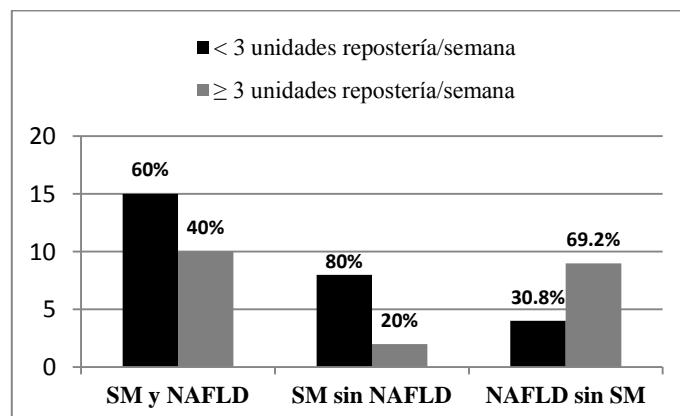


4.4.10. Repostería industrial

Si valoramos el consumo de repostería industrial en función de la adherencia o no adherencia al patrón de recomendación de la DME (< 3 unidades/semana), observamos que el consumo de repostería industrial ≥ 3 unidades/semana es significativamente más frecuente en el grupo NAFLD sin SM respecto al grupo SM y NAFLD y SM sin NAFLD; del mismo modo el consumo de repostería industrial < 3 unidades/semana es

significativamente más frecuente en el grupo SM sin NAFLD respecto al grupo NAFLD sin SM y SM y NAFLD. (**Figura R-41**).

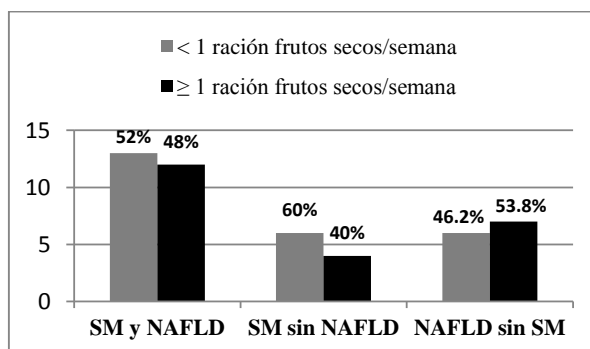
Figura R-41. Número de pacientes (N y %) según patrón de adherencia al consumo semanal de < 3 unidades de repostería industrial, clasificados según categoría a estudio.



4.4.11. Frutos secos

Si valoramos el consumo de frutos secos en función de la adherencia o no adherencia al patrón de recomendación de la DME (≥ 1 ración de 30 g/semana), observamos que no existe diferencia significativa entre los grupos. (**Figura R-42**)

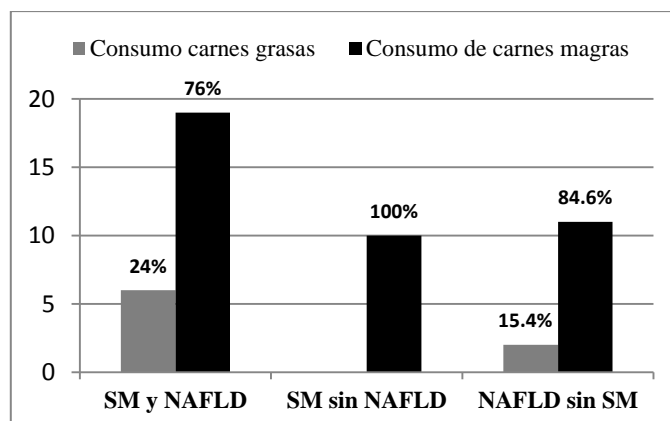
Figura R-42. Número de pacientes (N y %) según patrón de adherencia al consumo semanal de ≥ 1 ración de 30 g de frutos secos, clasificados según categoría a estudio.



4.4.12. Carnes magras y grasas

Si valoramos el consumo de carnes magras y grasas en función de la adherencia o no adherencia al patrón de recomendación de la DME (preferente carne de pollo, pavo o conejo), observamos que no existe diferencia significativa entre los grupos. (**Figura R-43**).

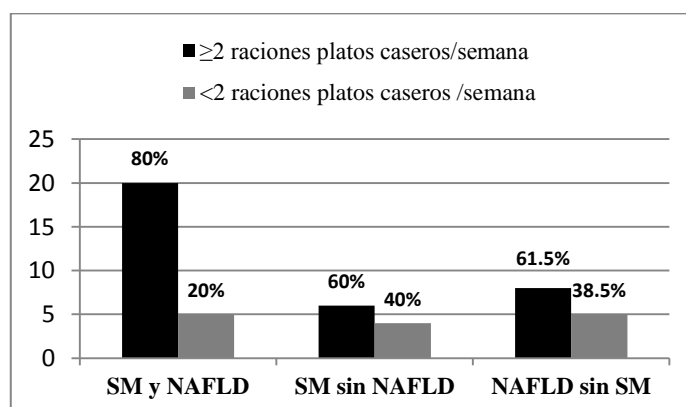
Figura R-43. Número de pacientes (N y %) según patrón de adherencia al consumo preferente de carnes magras, clasificados según categoría a estudio.



4.4.13. Platos caseros (sofrito).

Si valoramos el consumo de platos caseros (sofrito) en función de la adherencia o no adherencia al patrón de recomendación de la DME (≥ 2 raciones/semana), observamos que no existe diferencia significativa entre los grupos. (**Figura R-44**).

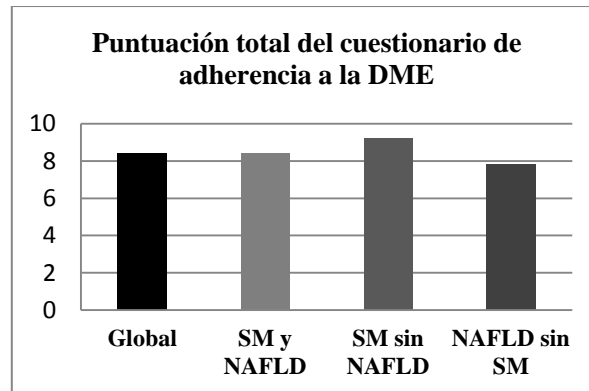
Figura R-44. Número de pacientes (N y %) según patrón de adherencia al consumo semanal de ≥ 2 raciones de platos caseros, clasificados según categoría a estudio.



4.4.14. Puntuación total del cuestionario de adherencia a DME

El valor medio de la puntuación total del cuestionario de adherencia a la DME fue 8.4 ± 2.0 puntos, sin diferencias entre grupos (SM y NAFLD: 8.4 ± 1.7 puntos; SM sin NAFLD: 9.2 ± 1.4 puntos y; NAFLD sin SM: 7.8 ± 2.7 puntos). (**Figura R-45**).

Figura R-45. Puntuación total del cuestionario de adherencia a la DME en el global de pacientes y clasificados según categoría a estudio.



4.5. VARIABLES EN RELACIÓN CON EL EJERCICIO FÍSICO

Los diferentes ítems recogidos dentro del cuestionario IPAQ se presentan en la **Tabla R-15**. En ella se recogen los resultados obtenidos tanto para el total de pacientes como para cada categoría del estudio.

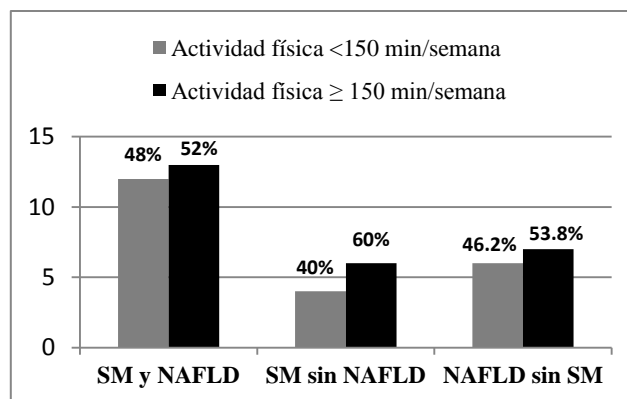
Tabla R-15. Variables en relación con el ejercicio físico

	Global		SM y NAFLD		SM sin NAFLD		NAFLD sin SM	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Actividad física < 150 min/semana	22	45.8	12	48	4	40	6	46.2
Actividad física ≥ 150 min/semana	26	54.2	13	52	6	60	7	53.8
	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ
IPAQ intenso min*días/semana	76.2	± 263.7	76.8	± 337.4	111	± 185.5	48.4	± 130.5
IPAQ moderado min*días/semana	377.1	± 894.7	319.2	± 752.7	133.5	± 337.6	676.1	± 1328.0
IPAQ ligero min*días/semana	88.1	± 140.9	74.4	± 123.1	159	± 204.4	60	± 103.2
IPAQ total min* días/semana	541.1	± 971.3	470.4	± 941.8	403.5	± 473.9	784.6	± 1289.4
Nº horas sentado/semana	22.3	± 17.4	22.8	± 15	25.5	± 16.9	18.8	± 22.4

4.5.1. Actividad física

Si valoramos la actividad física en función de la adherencia o no adherencia a las recomendaciones de las sociedades de expertos (≥ 150 min/semana), observamos que no existe diferencia significativa entre los grupos. (**Figura R-46**).

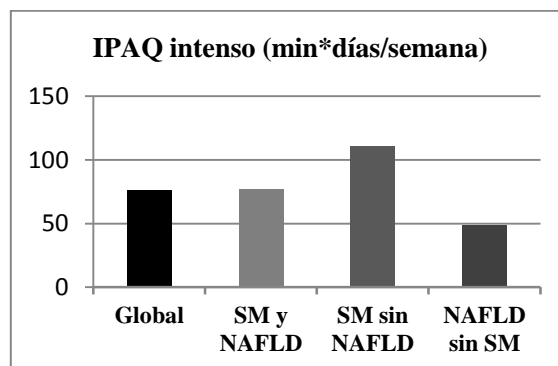
Figura R-46. Número de pacientes (N y %) según patrón de ejercicio físico semanal ≥ 150 minutos, clasificados según categoría a estudio.



4.5.2. IPAQ intenso

El valor medio de IPAQ intenso de la población fue de 76.2 ± 263.7 min*días/semana. En sujetos SM y NAFLD, el valor IPAQ intenso medio fue de 76.8 ± 337.4 min*días/semana; en aquellos con SM sin NAFLD fue 111 ± 185.5 min*días/semana y en NAFLD sin SM fue 48.4 ± 130.5 min*días/semana. No se hallaron diferencias significativas. (**Figura R-47**).

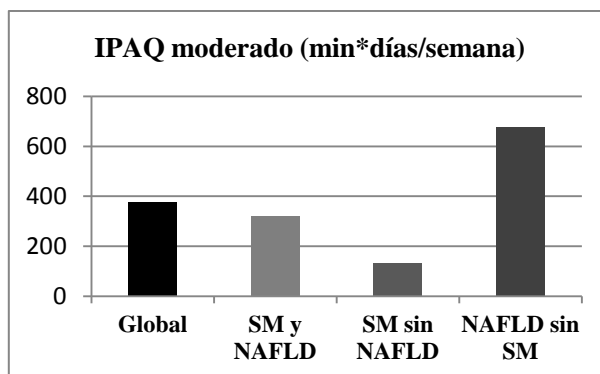
Figura R-47. IPAQ intenso (min*días/semana) en el global de pacientes y clasificados según categoría a estudio.



4.5.3. IPAQ moderado

El valor medio de IPAQ moderado de la población fue de 377.1 ± 894.7 min*días/semana. En sujetos SM y NAFLD, el valor IPAQ moderado medio fue de 319.2 ± 752.7 min*días/semana; en aquellos con SM sin NAFLD fue 133.5 ± 337.6 min*días/semana y en NAFLD sin SM fue 676.1 ± 1328 min*días/semana. No se hallaron diferencias significativas. (**Figura R-48**).

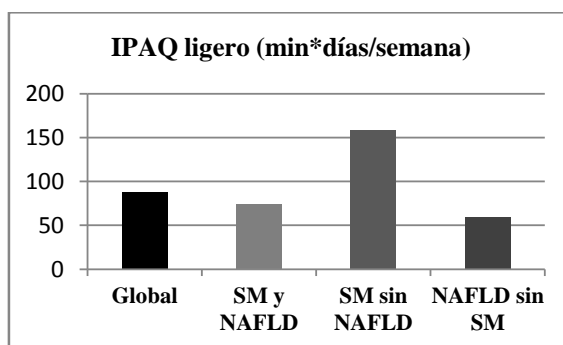
Figura R-48. IPAQ moderado (min*días/semana) en el global de pacientes y clasificados según categoría a estudio.



4.5.4. IPAQ ligero

El valor medio de IPAQ ligero de la población fue de 88.1 ± 140.9 min*días/semana. En sujetos SM y NAFLD, el valor IPAQ ligero medio fue de 74.4 ± 123.1 min*días/semana; en aquellos con SM sin NAFLD fue 159 ± 204.4 min*días/semana y en NAFLD sin SM fue 60 ± 103.2 min*días/semana. No se hallaron diferencias significativas. **(Figura R-49).**

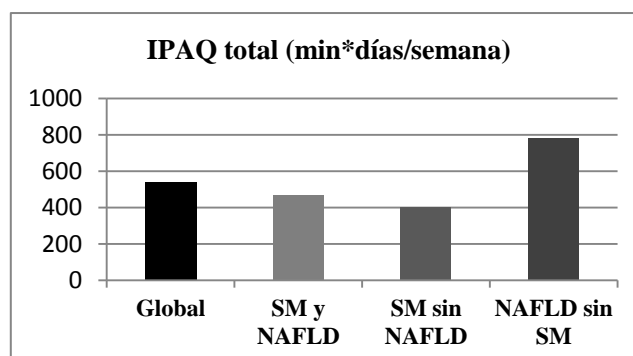
Figura R-49. IPAQ ligero (min*días/semana) en el global de pacientes y clasificados según categoría a estudio.



4.5.5. IPAQ total

El valor medio de IPAQ total de la población fue de 541.5 ± 971.3 min*días/semana. En sujetos SM y NAFLD, el valor IPAQ total medio fue de 470.4 ± 941.8 min*días/semana; en aquellos con SM sin NAFLD fue 403.5 ± 473.9 min*días/semana y en NAFLD sin SM fue 784.6 ± 1289.4 min*días/semana. No se hallaron diferencias significativas. **(Figura R-50)**

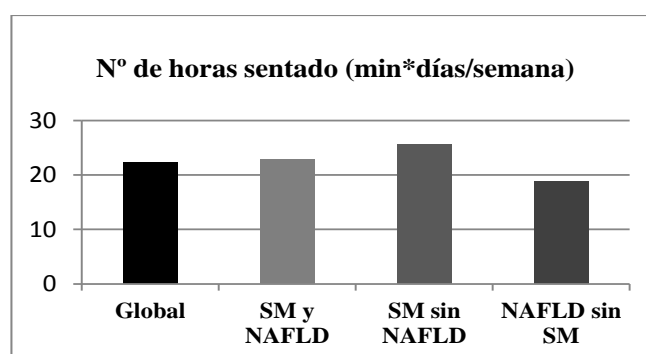
Figura R-50. IPAQ total (min*días/semana) en el global de pacientes y clasificados según categoría a estudio.



4.5.6. Número de horas sentado

El valor medio de número de horas sentado de la población fue de 22.3 ± 17.4 horas*días/semana. En sujetos SM y NAFLD, el valor medio de número de horas sentado fue de 22.8 ± 15 horas*días/semana; en aquellos con SM sin NAFLD fue 25.5 ± 16.9 min*días/semana y en NAFLD sin SM fue 18.8 ± 22.4 horas*días/semana. No se hallaron diferencias significativas. (**Figura R-51**).

Figura R-51. N° de horas sentado (min*días/semana) en el global de pacientes y clasificados según categoría a estudio.



4.6. VARIABLES EN RELACIÓN CON LA MICROBIOTA INTESTINAL

Las diferentes variables en relación con la abundancia relativa, el ratio entre filos y el “fold change” (veces que más se expresa) de la microbiota intestinal medidas en el estudio se presentan en las **Tabla R-16** y **Tabla R-17**. En ella se recogen los resultados obtenidos tanto para el total de pacientes como para cada categoría del estudio.

Tabla R-16. Variables en relación con la abundancia relativa y ratio de la microbiota intestinal

	Global	SM y NAFLD	SM sin NAFLD	NAFLD sin SM
	\bar{x} σ	\bar{x} σ	\bar{x} σ	\bar{x} σ
RQ Bacteroidetes	0.27 \pm 0.15	0.30 \pm 0.18	0.22 \pm 0.13	0.25 \pm 0.77
RQ Firmicutes	0.24 \pm 0.09	0.21 \pm 0.09 ^a	0.25 \pm 0.08	0.29 \pm 0.08 ^a
RQ Actinobacterias	1.7E-4 \pm 1.2E-3	1.1 E- 6 \pm 3.5E-6	4.55 E-7 \pm 9.2 E-7	6.9 E-4 \pm 2.41 E-3
RQ Fusobacterias	0.007 \pm 0.006	0.006 \pm 0.005	0.010 \pm 0.006	0.007 \pm 0.008
Ratio Firmicutes / Bacteroidetes	2133.1 \pm 9369.8	1417.5 \pm 6542.5	111.1 \pm 234.2	4990.9 \pm 15648.9

^a P <0.05: diferencias significativas entre los grupos.

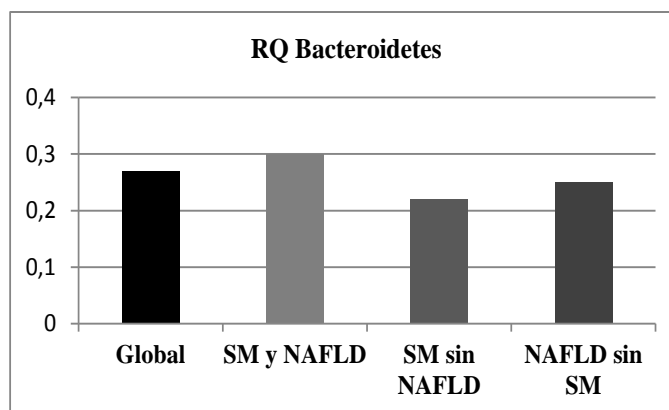
Tabla R-17. Variables en relación con el fold change de la microbiota intestinal

	Global	SM y NAFLD	SM sin NAFLD	NAFLD sin SM
	\bar{x} σ	\bar{x} σ	\bar{x} σ	\bar{x} σ
ΔCt Bacteroidetes	2.03 \pm 0.71	1.93 \pm 0.80	2.31 \pm 0.7	2.02 \pm 0.11
ΔCt Firmicutes	2.15 \pm 0.67	2.38 \pm 0.74 ^a	2.03 \pm 0.55	1.82 \pm 0.44 ^a
ΔCt Actinobacterias	21.51 \pm 3.04	21.69 \pm 2.11	22.8 \pm 2.28	20.07 \pm 4.52
ΔCt Fusobacterias	8.25 \pm 2.75	8.34 \pm 2.49	7.22 \pm 1.80	8.85 \pm 3.69

4.6.1. RQ Bacteroidetes

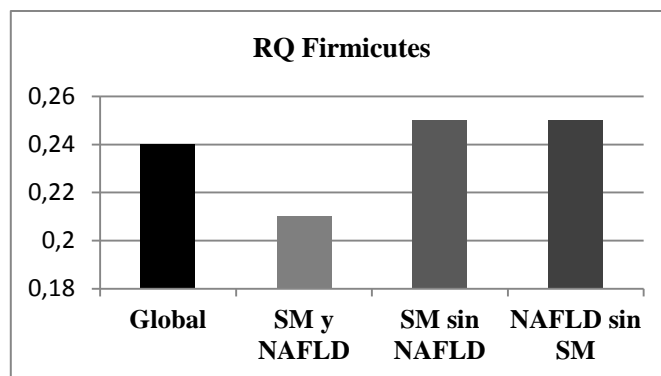
La abundancia relativa (RQ) media de bacteroidetes de la población estudiada fue 0.27 \pm 0.15. No hubo diferencias significativas respecto a RQ bacteroidetes en los sujetos en función de su clasificación en SM y NAFLD (0.30 \pm 0.18), SM sin NAFLD (0.22 \pm 0.13) y NAFLD sin SM (0.25 \pm 0.77). (**Figura R-52**).

Figura R-52. RQ bacteroidetes en el global de pacientes y clasificados según categorías a estudio



4.6.2. RQ Firmicutes

La abundancia relativa (RQ) media de firmicutes de la población estudiada fue 0.24 \pm 0.09. Se objetivó mayor abundancia relativa estadísticamente significativas en NAFLD sin SM (0.29 \pm 0.08) y SM y NAFLD (0.21 \pm 0.09) respecto a RQ firmicutes en SM sin NAFLD (0.25 \pm 0.08) (**Figura R-53**).

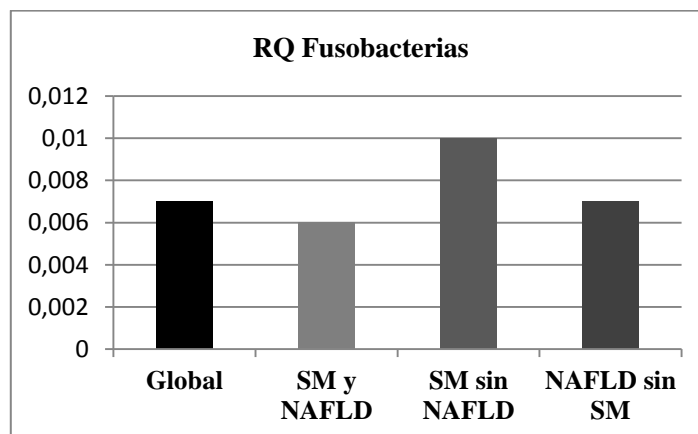
Figura R-53. RQ firmicutes en el global de pacientes y clasificados según categorías a estudio

4.6.3. RQ Actinobacterias

La abundancia relativa (RQ) media de actinobacterias de la población fue de $1.7 \text{ E-}4 \pm 1.2 \text{ E-}3$. En sujetos SM y NAFLD, la RQ media fue de $1.1 \text{ E-}6 \pm 3.5 \text{ E-}6$; en aquellos con SM sin NAFLD fue $4.5 \text{ E-}7 \pm 9.2 \text{ E-}7$ y en NAFLD sin SM fue $6.9 \text{ E-}4 \pm 2.4 \text{ E-}3$. No se hallaron diferencias significativas.

4.6.4. RQ Fusobacterias

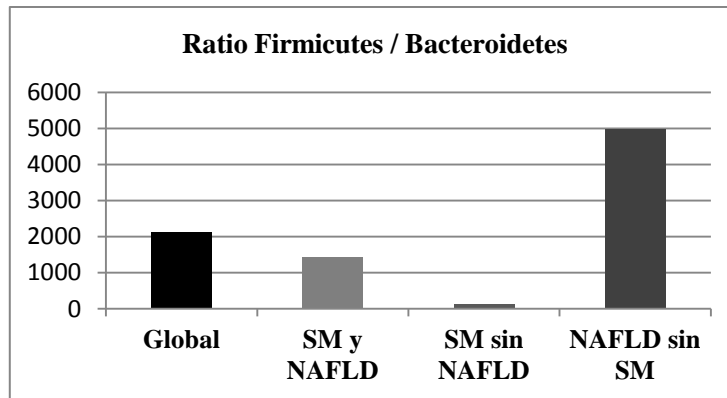
La abundancia relativa (RQ) media de fusobacterias de la población fue 0.007 ± 0.006 ; 0.006 ± 0.005 en sujetos con SM y NAFLD, 0.010 ± 0.006 en sujetos con SM sin NAFLD y 0.007 ± 0.008 en sujetos NAFLD sin SM. La RQ media de fusobacterias de los grupos no mostró diferencias significativas. (**Figura R-54**).

Figura R-54. RQ fusobacterias en el global de pacientes y según categorías a estudio

4.6.5. Ratio Firmicutes/Bacteroidetes

El ratio firmicutes/bacteroidetes medio de la población estudiada fue 2113.1 ± 9369.8 . No hubo diferencias significativas respecto al ratio firmicutes/bacteroidetes en los sujetos en función de su clasificación en SM y NAFLD (1417.5 ± 6542.5), SM sin NAFLD (111.1 ± 234.2) y NAFLD sin SM (4990.9 ± 15648.9). (**Figura R-55**).

Figura R-55. Ratio firmicutes/bacteroidetes en el global de pacientes y según categorías a estudio



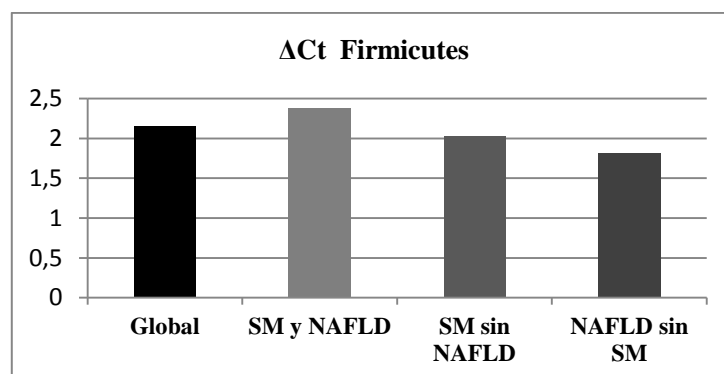
4.6.6. Δ Ct Bacteroidetes

El fold change o veces que más se expresa (Δ Ct) de bacteroidetes de la población fue 2.03 ± 0.71 ; 1.93 ± 0.080 en sujetos con SM y NAFLD, 2.31 ± 0.76 en sujetos con SM sin NAFLD y 2.02 ± 0.41 en sujetos NAFLD sin SM. No mostró diferencias significativas.

4.6.7. Δ Ct Firmicutes

El fold change o veces que más se expresa (Δ Ct) de firmicutes de la población fue 2.15 ± 0.67 . Se objetivó diferencias estadísticamente significativas en SM y NAFLD (2.38 ± 0.74) y NAFLD sin SM (1.82 ± 0.44) y respecto a Δ Ct firmicutes en SM sin NAFLD (2.03 ± 0.55) (**Figura R-56**).

Figura R-56. Δ Ct firmicutes en el global de pacientes y según categorías a estudio



4.6.8. Δ Ct Actinobacterias

El fold change o veces que más se expresa (Δ Ct) de actinobacterias de la población fue 21.51 ± 3.04 ; 21.69 ± 2.11 en sujetos con SM y NAFLD, 22.8 ± 2.28 en sujetos con SM sin NAFLD y 21.69 ± 2.11 en sujetos NAFLD sin SM. No hubo diferencias estadísticamente significativas.

4.6.9. Δ Ct Fusobacterias

El fold change o veces que más se expresa (Δ Ct) de fusobacterias de la población fue 8.25 ± 2.75 ; 8.34 ± 2.49 en sujetos con SM y NAFLD, 7.22 ± 1.8 en sujetos con SM sin NAFLD y 8.85 ± 3.69 en sujetos NAFLD sin SM. No hubo diferencias estadísticamente significativas.

4.7. ASOCIACIONES DE LAS VARIABLES ANTROPOMÉTRICAS Y BIOQUÍMICAS DEL ESTUDIO.

4.7.1. Asociaciones de las variables antropométricas entre sí.

En la **Tabla R-18** se muestran las correlaciones significativas entre las distintas variables antropométricas entre sí. El resto de correlaciones analizadas no han sido significativas (datos no mostrados).

Tabla R-18. Correlaciones de las variables antropométricas entre sí.

	Edad	IMC	Cintura (cm)	Metabolismo Basal (Kcal)	Impedancia	Masa Grasa (Kg)	Masa Magra (Kg)
Edad	n.s.	n.s.	n.s.	-0.43 (<0.002)	n.s.	n.s.	-0.34 (<0.016)
IMC	n.s.	n.s.	0.83 (<0.000)	0.32 (<0.023)	-0.55 (<0.000)	0.88 (<0.000)	n.s.
Cintura (cm)	n.s.	0.83 (<0.000)	n.s.	0.51 (<0.000)	-0.58 (<0.000)	0.71 (<0.000)	0.41 (<0.003)
Metabolismo Basal	-0.43 (<0.002)	0.32 (<0.023)	0.51 (<0.000)	n.s.	-0.61 (<0.000)	0.29 (<0.040)	0.95 (<0.000)
Impedancia	n.s.	-0.55 (<0.000)	-0.58 (<0.000)	-0.61 (<0.000)	n.s.	-0.29 (<0.045)	-0.67 (<0.000)
Masa Grasa (Kg)	n.s.	0.88 (<0.000)	0.71 (<0.000)	0.29 (<0.040)	-0.29 (<0.045)	n.s.	n.s.
Masa Magra (Kg)	-0.34 (<0.016)	n.s.	0.41 (<0.003)	0.95 (<0.000)	-0.67 (<0.000)	n.s.	n.s.

4.7.1.1. Edad

Se ha encontrado una correlación negativa significativa entre la edad con el metabolismo basal ($r = -0.43$, $p < 0.002$). (**Figura R-57**) También se ha evidenciado una correlación negativa entre la edad y la masa magra en Kg ($r = -0.34$, $p < 0.016$). (**Figura R-58**)

Figura R-57. Correlación edad -metabolismo basal según categoría a estudio.

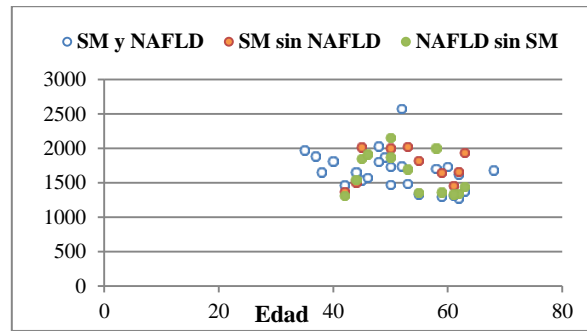
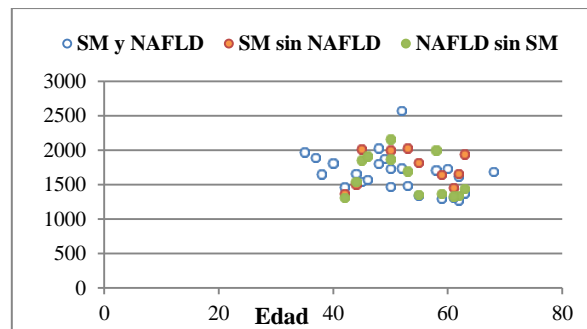


Figura R-57. Correlación edad -metabolismo basal según categoría a estudio.

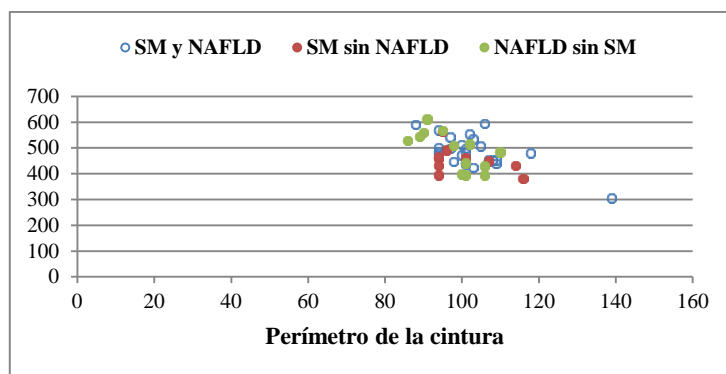


4.7.1.2. Índice de masa corporal

Se ha encontrado una correlación positiva significativa entre el IMC con el perímetro de la cintura ($r=0.83$, $p<0.000$), entre el IMC y el metabolismo basal ($r=0.32$, $p<0.023$) y entre el IMC con la masa grasa ($r=0.88$, $p<0.000$). También se ha evidenciado una correlación negativa entre el IMC y impedancia ($r=-0.55$, $p<0.000$).

4.7.1.3. Perímetro de la cintura

Además de la correlación previamente comentada con el IMC (ver 4.7.1.2.), se ha evidenciado una correlación positiva entre perímetro de la cintura con el metabolismo basal ($r=0.51$, $p<0.000$), entre perímetro de la cintura con masa grasa ($r=0.71$, $p<0.000$) y entre perímetro de la cintura y masa magra ($r=0.41$, $p<0.003$). Además, existe una correlación negativa entre perímetro de la cintura e impedancia ($r=-0.58$, $p<0.000$). (**Figura R-59**).

Figura R-59. Correlación perímetro de la cintura-impedancia según categoría a estudio

4.7.1.4. Metabolismo basal

Además de las correlaciones previamente comentadas con la edad (ver 4.7.1.1.), con el IMC (ver 4.7.1.2.) y con el perímetro de la cintura (ver 4.7.1.3.), se ha encontrado una correlación positiva significativa con la masa grasa en Kg ($r= 0.29$, $p<0.040$) y con la masa magra en Kg ($r= 0.95$, $p<0.000$). Por otra parte, se ha evidenciado una correlación negativa con la impedancia ($r=-0.61$, $p<0.000$).

4.7.1.5. Impedancia

Además de las correlaciones negativas previamente comentadas con el IMC (ver 4.7.1.2.), con el perímetro de la cintura (ver 4.7.1.3.) y con el metabolismo basal (ver 4.7.1.4.), se han evidenciado correlaciones negativas significativas con la masa grasa ($r= -0.29$, $p<0.045$) y la masa magra ($r= -0.67$, $p<0.000$).

4.7.1.6. Masa grasa

Correlaciones comentadas en apartados 4.7.1.2., 4.7.1.3., 4.7.1.4. y 4.7.1.5.

4.7.1.7. Masa magra

Correlaciones comentadas en apartados 4.7.1.1., 4.7.1.3., 4.7.1.4. y 4.7.1.5.

4.7.2. Asociaciones de las variables bioquímicas entre sí.

En la **Tabla R-19** se muestran las correlaciones significativas entre las distintas variables bioquímicas entre sí. El resto de correlaciones analizadas no han sido significativas (datos no mostrados)

Tabla R-19. Correlaciones de las variables bioquímicas entre sí.

	Glucosa	HbA1c	Insulina	Péptido C	Col-total	Col-HDL	TG	GOT	GPT	GGT
Glucosa	n.s.	0.87 (<0.000)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
HbA1c	0.87 (<0.000)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Insulina	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-0.29 (<0.039)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Péptido C	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-0.29 (<0.044)	0.40 (<0.005)	n.s.	n.s.	n.s.
Col-Total	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.32 (<0.025)	n.s.	n.s.	n.s.
Col-HDL	n.s.	n.s.	-0.29 (<0.039)	-0.29 (<0.044)	n.s.	n.s.	-0.42 (<0.002)	n.s.	n.s.	0.49 (<0.000)
TG	n.s.	n.s.	n.s.	0.40 (<0.005)	n.s.	-0.42 (<0.002)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
GOT	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.89 (<0.000)	0.63 (<0.008)
GPT	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.89 (<0.000)	n.s.	0.59 (<0.000)
GGT	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.63 (<0.008)	0.59 (<0.000)	n.s.

4.7.2.1. Glucosa

Se ha encontrado una correlación positiva significativa entre la glucosa con HbA1c ($r=0.87$, $p<0.000$).

4.7.2.2. HbA1c

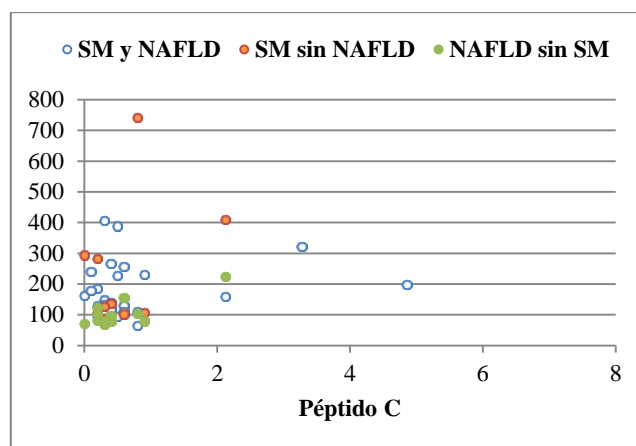
Correlación comentada en apartado 4.7.2.1.

4.7.2.3. Insulina

Se ha evidenciado una correlación negativa entre Insulina con HDL-Colesterol ($r=-0.29$, $p<0.039$).

4.7.2.4. Péptido C

Se ha encontrado una correlación positiva significativa entre el Péptido C con los triglicéridos ($r=0.40$, $p<0.005$). (**Figura R-60**) También se ha evidenciado una correlación negativa entre el Péptido C y HDL-Colesterol ($r=-0.29$, $p<0.044$).

Figura R-60. Correlación Péptido C –triglicéridos según categoría a estudio.

4.7.2.5. Colesterol total

Se ha encontrado una correlación positiva significativa entre el Colesterol total con los Triglicéridos ($r= 0.32$, $p< 0.025$).

4.7.2.6. HDL-Colesterol

Además de las correlaciones negativas previamente comentadas con Insulina (ver 4.7.2.3.) y Péptido C (ver 4.7.2.4.), se ha encontrado una correlación positiva significativa entre HDL-Colesterol con GGT ($r= 0.49$, $p < 0.000$) y una correlación negativa significativa entre HDL-Colesterol y triglicéridos ($r= -0.42$, $p<0.002$).

4.7.2.7. Triglicéridos

Correlaciones comentadas en apartados 4.7.2.4. y 4.7.2.6.

4.7.2.8. GOT

Se ha encontrado una correlación positiva significativa entre GOT con GPT ($r= 0.89$, $p< 0.000$) y entre GOT y GGT ($r= 0.63$, $p< 0.008$).

4.7.2.9. GPT

Además de la correlación positiva comentada (ver 4.7.2.8), se ha evidenciado una correlación positiva significativa entre GPT con GPT ($r= 0.59$, $p< 0.000$).

4.7.2.10. GGT

Correlaciones comentadas en apartados 4.7.2.8 y 4.7.2.9.

4.7.3. Asociaciones entre variables antropométricas y bioquímicas.

En la **Tabla R-20** se muestran las correlaciones significativas entre las distintas variables antropométricas y bioquímicas. El resto de correlaciones analizadas no han sido significativas (datos no mostrados).

Tabla R-20. Correlaciones entre variables antropométricas y bioquímicas.

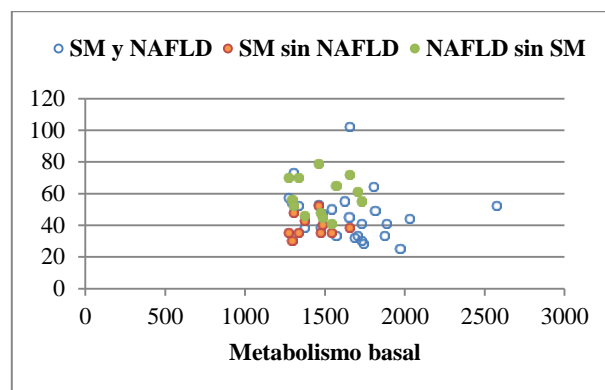
	Glucosa	HbA1c	Insulina	Péptido C	Col-total	Col-HDL	TG	GOT	GPT	GGT
Edad	0.40 (<0.004)	0.40 (<0.005)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
IMC	n.s.	n.s.	0.33 (<0.021)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Cintura (cm)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Metabolismo Basal	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-0.29 (<0.045)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Impedancia	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-0.36 (<0.010)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Masa Grasa (Kg)	n.s.	n.s.	0.39 (<0.006)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Masa Magra (Kg)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-0.34 (<0.016)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Se ha encontrado una correlación positiva significativa entre edad con la glucosa ($r=0.40$, $p<0.004$) y entre edad con HbA1c ($r=0.40$, $p<0.005$).

También se ha evidenciado una correlación positiva significativa entre el IMC y la Insulina ($r=0.33$, $p<0.021$).

Se ha encontrado una correlación negativa significativa entre metabolismo basal con HDL-Colesterol ($r=-0.29$, $p<0.045$). (**Figura R-61**).

Figura R-61. Correlación Metabolismo Basal –HDL-colesterol según categoría a estudio.



También se ha evidenciado una correlación positiva significativa entre Impedancia y HDL-Colesterol ($r=-0.36$, $p<0.010$).

Existe una correlación positiva significativa entre masa grasa e Insulina ($r=0.39$, $p<0.006$) y una correlación significativa negativa entre masa magra HDL-Colesterol ($r=-0.34$, $p<0.016$).

4.8. ASOCIACIONES DE LAS VARIABLES RELACIONADAS CON NAFLD DEL ESTUDIO.

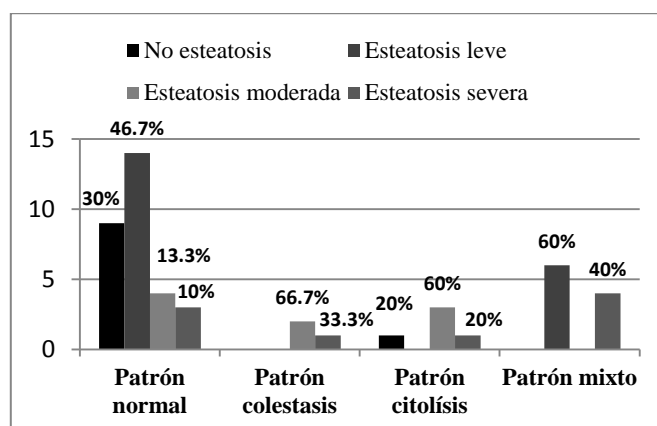
4.8.1. Patrón de transaminasas.

Si valoramos la correlación del patrón de transaminasas con el patrón de severidad ecográfica, observamos que el mayor porcentaje de esteatosis ecográfica leve (46.7%) se corresponde con un patrón normal de transaminasas y que el mayor porcentaje de esteatosis ecográfica severa (40%) corresponde a un patrón mixto de transaminasas. No existen diferencias estadísticas significativas (**Tabla R-21**) (**Figura R-62**).

Tabla R-21. Correlaciones entre patrón de transaminasas y patrón ecográfico.

	No esteatosis		Esteatosis leve		Esteatosis moderada		Esteatosis severa	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Patrón normal	9	30	14	46.7	4	13.3	3	10
Patrón colestasis	0	0	0	0	2	66.7	1	33.3
Patrón citolisis	1	20	0	0	3	60	1	20
Patrón mixto	0	0	6	60	0	0	4	40

Figura R-62. Correlación entre patrón de transaminasas y patrón ecográfico.

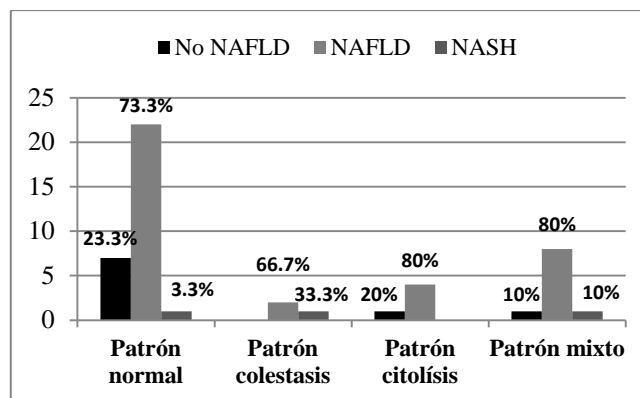


De forma paralela a lo anteriormente comentado, si valoramos la correlación del patrón de transaminasas con el patrón de severidad OWLiver Test, observamos que el mayor porcentaje de esteatosis (73.3%) se corresponde con un patrón normal de transaminasas y que el menor porcentaje de NASH (0%) corresponde a un patrón citolítico de transaminasas. No existen diferencias estadísticas significativas (**Tabla R-22**) (**Figura R-63**).

Tabla R-22. Correlaciones entre patrón de transaminasas y patrón OWLiver Test.

	No NAFLD		NAFLD		NASH	
	N	%	N	%	N	%
Patrón normal	7	23.3	22	73.3	1	3.3
Patrón colestasis	0	0	2	66.7	1	33.3
Patrón citolisis	1	20	4	80	0	0
Patrón mixto	1	10	8	80	1	10

Figura R-63. Correlación entre patrón de transaminasas y patrón OWLiver Test.



No se ha evidenciado correlación significativa entre el patrón de transaminasas y las distintas variables en relación con SM (datos no mostrados). Tampoco se ha observado diferencias estadísticas significativas en la correlación entre el patrón de transaminasas y las variables en relación con adherencia a la dieta mediterránea o entre el patrón de transaminasas y las variables en relación con el ejercicio físico.

4.8.2. Ecografía de abdomen.

No se ha evidenciado correlación significativa entre el patrón de severidad ecográfico y las distintas variables en relación con SM (datos no mostrados). Tampoco se ha observado diferencias estadísticas significativas en la correlación entre el patrón de severidad ecográfico y las variables en relación con adherencia a la dieta mediterránea o entre el patrón de severidad ecográfico y las variables en relación con el ejercicio físico.

4.8.3. OWLiver Test.

No se ha evidenciado correlación significativa entre el patrón de severidad OWLiver y las distintas variables antropométricas y bioquímicas, ni entre el patrón de severidad OWLiver y las variables en relación con SM (datos no mostrados). Tampoco se ha observado diferencias estadísticas significativas en la correlación entre el patrón de severidad OWLiver y las variables en relación con adherencia a la dieta mediterránea o entre el patrón de severidad OWLiver y las variables en relación con el ejercicio físico.

4.9. ASOCIACIONES DE LAS VARIABLES RELACIONADAS CON SM DEL ESTUDIO.

4.9.1. Hiperglucemia

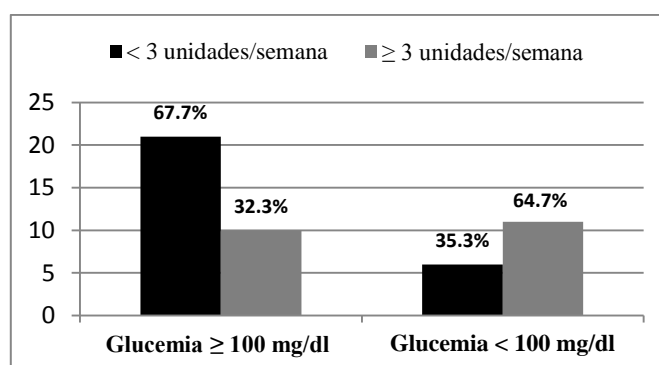
Si valoramos la correlación de glucemia basal elevada (≥ 100 mg/dl) con el patrón de consumo de repostería industrial, se evidencia una correlación estadísticamente significativa. Observamos que el mayor porcentaje de sujetos con glucemia ≥ 100 mg/dl (67.7%) consume repostería industrial < 3 veces/semana. Paradójicamente, el mayor porcentaje de sujetos con glucemia < 100 mg/dl (64.7%) consume repostería industrial > 3 veces/semana. (Tabla R-23) (Figura R-64).

Tabla R-23. Correlaciones entre glucemia ≥ 100 mg/dl y patrón de consumo de repostería industrial.

	< 3 unidades/semana		≥ 3 unidades/semana	
	N	%	N	%
Glucemia ≥ 100 mg/dl	21	67.7 ^a	10	32.3
Glucemia < 100 mg/dl	6	35.3	11	64.7 ^a

^a P < 0.05: hay correlación entre las variables.

Figura R-64. Correlación entre glucemia ≥ 100 mg/dl y patrón de consumo de repostería industrial.



4.9.2. Número de factores de riesgo de SM

Se ha encontrado una correlación positiva significativa entre el número de factores de riesgo de SM con la glucosa basal ($r = 0.34$, $p < 0.017$), entre el número de factores de riesgo de SM y la HbA1c ($r = 0.36$, $p < 0.011$), entre el número de factores de riesgo de SM y el péptido C ($r = 0.35$, $p < 0.013$) y entre el número de factores de riesgo de SM y los triglicéridos ($r = 0.51$, $p < 0.00$). También se ha evidenciado una correlación negativa entre el número de factores de riesgo de SM con el HDL-Colesterol ($r = -0.57$, $p < 0.000$).

No se han evidenciado otras correlaciones significativas entre las distintas variables en relación con SM con variables en relación a la adherencia a la dieta mediterránea. Tampoco se ha observado diferencias estadísticas entre las distintas

variables en relación con SM y variables en relación con el ejercicio físico (datos no mostrados).

4.10. ASOCIACIONES DE LAS VARIABLES RELACIONADAS CON ADHERENCIA A LA DIETA MEDITERRÁNEA DEL ESTUDIO.

Además de la correlación anteriormente comentada entre patrón de consumo de repostería industrial y glucemia ≥ 100 mg/dl (ver 4.9.1.), no se han evidenciado otras diferencias significativas entre las variables relacionadas con la adherencia a la dieta mediterránea y las variables en relación con el ejercicio físico (datos no mostrados).

4.11. ASOCIACIONES DE LAS VARIABLES RELACIONADAS CON LA MICROBIOTA INTESTINAL DEL ESTUDIO

4.11.1. Asociaciones entre variables antropométricas y de la microbiota intestinal.

No se ha evidenciado correlación significativa entre las principales variables antropométricas (IMC, perímetro de la cintura y masa magra por impedanciometría) y las diferentes variables de microbiota intestinal.

4.11.2. Asociaciones entre variables bioquímicas y de la microbiota intestinal

Tampoco existen correlaciones significativas entre las variables bioquímicas (Glucosa, Hb A1c y péptido C) y las diferentes variables de la microbiota intestinal.

4.11.3. Asociaciones entre variables de NAFLD y de la microbiota intestinal

4.11.3.1. Ecografía abdominal.

Las asociaciones entre el patrón de severidad ecográfico y las diferentes variables relacionadas con la microbiota intestinal se representan en la **Tabla R-24** y en la **Tabla R-25**. No se evidencian diferencias estadísticamente significativas.

Tabla R-24. Asociaciones entre el patrón de severidad ecográfico y la microbiota intestinal (RQ)

	No esteatosis		Esteatosis ligera		Esteatosis moderada		Esteatosis severa	
	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ
RQ Bacteroidetes	0.22 ± 0.13		0.31 ± 0.19		0.27 ± 0.99		0.23 ± 0.80	
RQ Firmicutes	0.25 ± 0.88		0.24 ± 0.10		0.23 ± 0.92		0.24 ± 0.10	
RQ Actinobacterias	0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00	
RQ Fusobacterias	0.01 ± 0.00		0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00	

Tabla R-25. Asociaciones entre el patrón de severidad ecográfico y la microbiota intestinal (Δ Ct)

	No esteatosis		Esteatosis ligera		Esteatosis moderada		Esteatosis severa	
	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ
ΔCt Bacteroidetes	2.31 ± 0.76		1.88 ± 0.80		1.96 ± 0.54		2.15 ± 0.57	
ΔCt Firmicutes	2.03 ± 0.55		2.14 ± 0.64		2.23 ± 0.70		2.25 ± 0.90	
ΔCt Actinobacterias	22.8 ± 2.28		20.9 ± 4.09		20.9 ± 1.73		21.7 ± 2.08	
ΔCt Fusobacterias	7.22 ± 1.8		8.23 ± 2.94		9.19 ± 2.3		8.47 ± 3.56	

4.11.3.2. OWLiver Test

Las asociaciones entre el patrón de severidad OWLiver Test y las diferentes variables relacionadas con la microbiota intestinal se representan en la **Tabla R-26** y en la **Tabla R-27**. No se evidencian diferencias estadísticamente significativas.

Tabla R-26. Asociaciones entre el patrón de severidad OWLiver Test y la microbiota intestinal (RQ)

	No NAFLD		NAFLD		NASH	
	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ
RQ Bacteroidetes	0.22 ± 0.12		0.29 ± 0.16		0.25 ± 0.04	
RQ Firmicutes	0.23 ± 0.11		0.23 ± 0.09		0.33 ± 0.00	
RQ Actinobacterias	0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00	
RQ Fusobacterias	0.01 ± 0.00		0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00	

Tabla R-27. Asociaciones entre el patrón de severidad OWLiver Test y la microbiota intestinal (Δ Ct)

	No NAFLD		NAFLD		NASH	
	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ
ΔCt Bacteroidetes	2.33 ± 0.79		1.96 ± 0.71		2.00 ± 0.23	
ΔCt Firmicutes	2.29 ± 0.93		2.17 ± 0.61		1.55 ± 0.03	
ΔCt Actinobacterias	21.5 ± 2.85		21.5 ± 3.21		22.48 ± 1.71	
ΔCt Fusobacterias	7.89 ± 2.28		8.40 ± 2.97		7.51 ± 1.14	

4.11.4. Asociaciones entre variables de adherencia a la dieta mediterránea y la microbiota intestinal

4.11.4.1. Aceite de oliva

Las asociaciones entre el patrón de adherencia a la dieta mediterránea, expresado como la cantidad semanal de aceite de oliva consumido y las diferentes variables relacionadas con la microbiota intestinal se representan en la **Tabla R-28** y en la **Tabla R-29**. No se evidencian diferencias estadísticamente significativas.

Tabla R-28. Asociaciones entre el patrón de adherencia a la dieta mediterránea (aceite) y la microbiota intestinal (RQ)

	< 2 cucharadas/semana		≥ 2 cucharadas/semana	
	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ
RQ Bacteroidetes	0.35 ± 0.24		0.26 ± 0.13	
RQ Firmicutes	0.31 ± 0.79		0.23 ± 0.09	
RQ Actinobacterias	0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00	
RQ Fusobacterias	0.01 ± 0.00		0.00 ± 0.00	

Tabla R-29. Asociaciones entre el patrón de adherencia a la dieta mediterránea (aceite) y la microbiota intestinal (Δ Ct)

	< 2 cucharadas/semana		≥ 2 cucharadas/semana	
	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ
ΔCt Bacteroidetes	1.73 ± 0.83		2.08 ± 0.69	
ΔCt Firmicutes	1.72 ± 0.40		2.22 ± 0.68	
ΔCt Actinobacterias	22.9 ± 1.05		21.3 ± 3.18	
ΔCt Fusobacterias	6.99 ± 1.22		8.42 ± 2.87	

4.11.4.2. Vino

Las asociaciones entre el patrón de adherencia a la dieta mediterránea, expresado como la cantidad semanal de vino consumido y las diferentes variables relacionadas con la microbiota intestinal se representan en la **Tabla R-30** y en la **Tabla R-31**. No se evidencian diferencias estadísticamente significativas.

Tabla R-30. Asociaciones entre el patrón de adherencia a la dieta mediterránea (vino) y la microbiota intestinal (RQ)

	< 3 vasos vino/semana		≥ 3 vasos vino/semana	
	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ
RQ Bacteroidetes	0.28 ± 0.15		0.23 ± 0.11	
RQ Firmicutes	0.24 ± 0.09		0.26 ± 0.06	
RQ Actinobacterias	0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00	
RQ Fusobacterias	0.01 ± 0.00		0.00 ± 0.00	

Tabla R-31. Asociaciones entre el patrón de adherencia a la dieta mediterránea (vino) y la microbiota intestinal (Δ Ct)

	< 3 vasos vino/semana		≥ 3 vasos vino/semana	
	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ
ΔCt Bacteroidetes	2.00 ± 0.71		2.26 ± 0.71	
ΔCt Firmicutes	2.19 ± 0.70		1.96 ± 0.42	
ΔCt Actinobacterias	21.4 ± 3.18		21.8 ± 1.96	
ΔCt Fusobacterias	8.42 ± 2.92		7.24 ± 1.10	

4.11.5. Asociaciones entre variables relacionadas con el ejercicio físico y la microbiota intestinal

Las asociaciones entre el ejercicio físico y las diferentes variables relacionadas con la microbiota intestinal se representan en la **Tabla R-32** y en la **Tabla R-33**. No se evidencian diferencias estadísticamente significativas.

Tabla R-32. Asociaciones entre el ejercicio físico y la microbiota intestinal (RQ)

	< 150 min/semana		≥ 150 min/semana	
	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ
RQ Bacteroidetes	0.27 ± 0.15		0.27 ± 0.15	
RQ Firmicutes	0.23 ± 0.10		0.25 ± 0.09	
RQ Actinobacterias	0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00	
RQ Fusobacterias	0.01 ± 0.00		0.00 ± 0.00	

Tabla R-33. Asociaciones entre el ejercicio físico y la microbiota intestinal (Δ Ct)

	< 150 min/semana		≥ 150 min/semana	
	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ
ΔCt Bacteroidetes	2.01 ± 0.69		2.05 ± 0.74	
ΔCt Firmicutes	2.28 ± 0.77		2.04 ± 0.56	
ΔCt Actinobacterias	20.8 ± 4.03		22.0 ± 1.92	
ΔCt Fusobacterias	7.55 ± 1.99		8.83 ± 3.19	

4.11.6. Asociaciones entre variables de la microbiota entre sí

Las asociaciones entre las diferentes variables relacionadas con la microbiota intestinal entre sí se representan en la **Tabla R-34** y **Tabla R-35**.

Tabla R-34. Correlaciones entre las variables de la microbiota intestinal (Δ Ct) entre sí.

	Δ Ct Actinobacterias	Δ Ct Bacteroidetes	Δ Ct Firmicutes	Δ Ct Fusobacterias
Δ Ct Actinobacterias	1	n.s.	n.s.	n.s.
Δ Ct Bacteroidetes	n.s.	1	-0.38 (<0.007)	n.s.
Δ Ct Firmicutes	n.s.	-0.38 (<0.007)	1	n.s.
Δ Ct Fusobacterias	n.s.	n.s.	n.s.	1

Se ha encontrado una correlación negativa significativa entre Δ Ct Bacteroidetes y Δ Ct Bacteroidetes ($r = -0.38$, $p < 0.007$).

Tabla R-35. Correlaciones entre las variables de la microbiota intestinal (RQ) entre sí.

	RQ Bacteroidetes	RQ Actinobacterias	RQ Firmicutes	RQ Fusobacterias
RQ Bacteroidetes	1	n.s.	-0.31 (<0.029)	n.s.
RQ Actinobacterias	1	1	n.s.	0.29 (<0.043)
RQ Firmicutes	-0.31 (<0.029)	n.s.	1	n.s.
RQ Fusobacterias	n.s.	0.29 (<0.043)	n.s.	1

Se ha encontrado una correlación negativa significativa entre RQ Bacteroidetes y RQ Firmicutes ($r = -0.31$, $p < 0.029$) y una correlación positiva significativa entre RQ Actinobacterias y RQ Fusobacterias ($r = 0.29$, $p < 0.043$).

5. Discusión

5. Discusión

La Enfermedad Hepática Grasa No Alcohólica (NAFLD) se caracteriza por el depósito de grasa intrahepatocitaria, pudiendo estar asociada o no a diferentes grados de daño hepatocelular, cambios inflamatorios y fibrosis. En la actualidad podría considerarse que la NAFLD es el componente/consecuencia hepática del Síndrome Metabólico (SM), definido por la agrupación de diferentes factores de riesgo vascular y metabólico como la obesidad visceral, la hiperglucemia secundaria a resistencia a la insulina, la dislipemia y la hipertensión arterial. Debido a la creciente incidencia del SM en los países desarrollados, la NAFLD está emergiendo como una de las enfermedades hepáticas más frecuentes en nuestro medio. En el origen del SM, los factores dietéticos como la baja adherencia al patrón de dieta mediterránea y la escasa actividad física, condicionan un importante auge de esta patología.

Nuestro estudio está basado en los resultados obtenidos tras el análisis de 3 grupos poblacionales cuyo interés médico radica en sus características de riesgo, bien por aunar criterios diagnósticos de Síndrome Metabólico, de Enfermedad Hepática Grasa No Alcohólica, o, de ambos. El patrón fenotípico más característico representaría aquellos sujetos que presentan SM y NAFLD. Las situaciones discordantes analizadas; sujetos con SM sin NAFLD y sujetos con NAFLD sin SM, podrían ofrecernos explicaciones de interés respecto a la etiopatogenia y consecuencias clínicas de ambos cuadros.

La homogeneidad de los grupos ha sido establecida según características generales como edad, sexo o altura.

Los resultados obtenidos en los parámetros referentes a la presencia del SM nos muestran algunas diferencias entre los grupos.

El peso, su traducción a través del índice de masa corporal (IMC), el perímetro de la cintura y los datos de composición corporal (masa grasa/masa libre de grasa) son los principales aspectos de interés en el análisis de los resultados comparativos entre grupos en función de la existencia o no del SM. El exceso de peso corporal es sin duda un problema sanitario de primer orden por su prevalencia a nivel global. En la práctica se utiliza el IMC para determinar la presencia de obesidad en un sujeto. De acuerdo con la tendencia actual en las sociedades occidentalizadas, los datos de obesidad de nuestra serie, según el IMC,

revelan que los grupos SM sin NAFLD y NAFLD sin SM presentan una obesidad de tipo I (IMC 30-34.9 Kg/m²); (227) mientras que el grupo SM y NAFLD alcanza cifras de obesidad tipo II (IMC 35-39.9 Kg/m²). (227) Parece clara, por tanto, la concordancia ya descrita entre incremento del IMC y una mayor prevalencia de enfermedad metabólica ligada a NAFLD.

El patrón de distribución de la grasa tiene gran importancia clínica. En 2005, la IDF estableció como criterio fundamental para diagnosticar síndrome metabólico la obesidad central, (209) ya que la distribución visceral o abdominal de la grasa corporal es un factor que se correlaciona mejor con el riesgo de cardiopatía isquémica que la masa adiposa total. En la actualidad, para estimar la acumulación central de grasa se utiliza fundamentalmente el perímetro de la cintura. El valor de referencia de este parámetro difiere entre poblaciones. Para la población europea los valores que implican riesgo son ≥ 94 cm en hombres y ≥ 80 cm en mujeres. (228) El global de nuestra población a estudio, incluidos aquellos sujetos sin criterios de SM, mostraron valores de riesgo del perímetro de la cintura. Acorde a lo expuesto, nuestros datos ponen de manifiesto que un perímetro de la cintura elevado se relaciona con un mayor IMC y, en concreto, el 100% de los sujetos con SM y NAFLD (obesidad tipo II) presentan cintura de riesgo.

La determinación mediante impedanciometría bioeléctrica de parámetros como el porcentaje corporal de masa grasa y/o el de masa libre de grasa, aporta información clínica que no puede ser obtenida a partir de los parámetros antropométricos clásicos, complementando así la evaluación realizada a partir del IMC y el perímetro de la cintura.

En cuanto a la masa grasa, observamos un vínculo positivo entre la misma, el IMC y el perímetro de la cintura, por lo que no sorprende el hecho de que el valor medio de masa grasa objetivado sea superior en el grupo SM y NAFLD (33.4 kg en SM y NAFLD vs 27.5 Kg en SM sin NAFLD vs 28.6 Kg en NAFLD sin SM).

Los datos obtenidos en la composición corporal en el grupo con SM sin NAFLD sugieren un mayor componente de masa magra (60.1 Kg) frente a los otros grupos que tienen NAFLD (53.2 Kg en NAFLD sin SM vs 53.6 Kg en SM y NAFLD). Este resultado puede tener importancia en cuanto a que la masa magra

es el componente metabólico activo del organismo y probablemente uno de los factores protectores frente al desarrollo de NAFLD.

Por otra parte, es conocido que la masa magra es el principal determinante del metabolismo basal. El metabolismo basal o gasto energético basal representa el gasto de energía necesario para el mantenimiento de los procesos vitales y es el principal componente del gasto energético en condiciones normales. Cabe destacar que los sujetos con SM sin NAFLD, a pesar de tener un menor IMC respecto a SM y NAFLD, presentan un mayor metabolismo basal en relación con una mayor masa magra. Así, en los resultados obtenidos, a pesar de no haber hallado diferencias estadísticamente significativas, orientan a que el incremento de la masa magra y del metabolismo basal en sujetos con menor IMC está relacionado con un patrón de ejercicio físico determinado, en nuestro caso estimado mediante el cuestionario IPAQ (274) (275). Es bien conocido que el ejercicio físico es capaz de inducir un balance energético negativo no sólo por su coste directo de actividad física, sino también por su capacidad de desarrollo de masa magra y su consecuente efecto sobre el metabolismo basal. SM sin NAFLD es el grupo con mayor porcentaje de sujetos que llevan a cabo ejercicio físico (60% vs 52% en SM y NAFLD vs 53.8% en NAFLD sin SM), entendiendo éste como aquella actividad física que se practica ≥ 150 min/semana.

La mayor parte de los estudios demuestran que el gasto energético frente a una actividad física particular es superior en obesos que en delgados, debido a que tienen que realizar un mayor esfuerzo para desplazar un mayor peso corporal y, también en nuestra serie, se ha establecido de forma significativa una relación directamente proporcional entre el IMC y el metabolismo basal así como entre el perímetro de la cintura y el metabolismo basal. Otro factor en probable relación con el incremento de masa magra en sujetos con menor IMC, sería el patrón dietético, valorado mediante el test de adherencia a la Dieta Mediterránea. (263) El grupo SM sin NAFLD es el que de forma estadísticamente significativa presenta un mayor porcentaje de sujetos que consumen menos de 3 unidades de repostería industrial a la semana (80% vs 60% en SM y NAFLD vs 30.8% en NAFLD sin SM). Además, SM sin NAFLD es el grupo con mayor puntuación en la adherencia a la dieta mediterránea (9.2 puntos vs 8.4 puntos en SM y NAFLD y 7.8 puntos en NAFLD sin SM), circunstancia en concordancia con numerosos

estudios epidemiológicos (263) (264) (265) (266) que ponen de relieve los efectos beneficiosos y protectores de este tipo de dieta frente a enfermedades cardiovasculares y otras como NAFLD, asociadas con el estrés oxidativo.

El análisis del resultado del parámetro bioeléctrico puro de la impedancia es interesante por su correlación negativa ($r = -0.58$) con el perímetro de la cintura y por tanto, podría ser útil como marcador de riesgo de síndrome metabólico.

Los componentes clínico-analíticos del SM en nuestra serie reflejan algunas diferencias entre los fenotipos estudiados.

El riesgo de aparición de hiperglucemia y diabetes mellitus tipo 2 es heterogéneo entre los individuos obesos (237). Entre los parámetros diagnósticos de SM, la glucemia ≥ 100 mg/dl ha sido un hallazgo común en ambos grupos de SM, siendo más frecuente y con valores más elevados en el grupo SM sin NAFLD. Asimismo, en SM sin NAFLD es donde existe un mayor porcentaje de sujetos con DM establecida (40% vs 36% en SM y NAFLD vs 7.7% en NAFLD sin SM). Este dato nos ha parecido discordante respecto al patrón de ejercicio y consumo de repostería comentado con anterioridad y nos sugiere que es precisamente el predominio de diabéticos en este grupo poblacional lo que podría conllevar un hábito dietético y de ejercicio físico más disciplinario.

La hemoglobina glicosilada (HbA1c), mide el porcentaje de hemoglobina unida a la glucosa y refleja el promedio de los niveles de glucosa en sangre durante los últimos 2 - 3 meses (257). En el contexto de lo anterior, objetivamos un valor de HbA1c significativamente superior entre los sujetos con SM sin NAFLD.

La insulinemia basal, por si misma o formando parte de índices que la utilizan en su cálculo, se correlaciona con las estimaciones de la resistencia a la insulina. Estos datos son coherentes con el hecho de que en etapas precoces del trastorno del metabolismo de los hidratos de carbono (prediabetes) los valores de insulinemia son mayores a los encontrados en pacientes con diabetes manifiesta, ya que durante los años de evolución se evidencia una pérdida progresiva de la función de la célula beta con disminución de los niveles de insulina. En nuestra serie, los valores más elevados de insulina basal se encuentran entre los sujetos SM y NAFLD (16.1 ± 10 μ IU/ml), comparado con los sujetos SM sin NAFLD

(11.3 ± 8.2 μ IU/ml), lo que podría estar en relación con un mayor número de diabéticos en este último grupo.

Otros factores clásicos encontrados en nuestra serie en relación a los niveles de insulina son la asociación positiva objetivada entre ésta, el IMC (mayor en SM y NAFLD que en SM sin NAFLD) y la masa grasa (igualmente superior en SM y NAFLD que en SM sin NAFLD).

Respecto a los lípidos, los niveles de HDL-Colesterol son significativamente más bajos en individuos SM sin NAFLD, existiendo una relación inversa entre los valores de HDL-Colesterol e Insulina que podría mostrar el nexo de asociación entre insulinresistencia y HDL-Colesterol.

La combinación de HDL-Colesterol bajo y glucemia basal elevada (≥ 100 mg/dl) ha demostrado ser predictor de enfermedad coronaria. Asimismo, tanto el HDL-Colesterol bajo (<40 mg/dl en hombres y <50 mg/dl en mujeres) como los triglicéridos elevados (>150 mg/dl) son predictores independientes de riesgo cardiovascular en pacientes con SM. **(244)** Corroborando lo comentado, advertimos un HDL-Colesterol significativamente más elevado en los sujetos NAFLD sin SM, por lo que podría plantearse un papel protector cardiovascular del HDL-Colesterol en este ámbito.

Hemos comprobado que niveles bajos de HDL-Colesterol se asocian con un incremento de los triglicéridos. Los niveles de triglicéridos significativamente más elevados así como los niveles de HDL-Colesterol significativamente más bajos se hallan en el grupo SM sin NAFLD. El incremento del riesgo cardiovascular que se observa en la obesidad, sobre todo en la de distribución troncular, puede depender en gran medida de la presencia de este perfil lipídico “aterogénico”. **(245)**

Por otra parte, en nuestra serie, niveles bajos de HDL-Colesterol se relacionan con niveles elevados de insulina y péptido C. Paralelamente, la hipertrigliceridemia está vinculada con un incremento del péptido C, pero no con los niveles de insulina. Posiblemente este hecho se deba a que las concentraciones de péptido C son un indicador más estable del funcionamiento de las células beta que la concentración periférica de insulina.

La hipertensión arterial (HTA) es también un componente central en el SM, de manera que aproximadamente en la literatura, el 85% de los pacientes con

SM sufren esta condición. (239). En nuestro caso, el 84% de los sujetos con SM y NAFLD y el 70% de los individuos con SM sin NAFLD eran hipertensos, frente a un 7.7% en el grupo sin enfermedad metabólica. A la vista de estos hallazgos, podemos proponer el diagnóstico de hipertensión arterial como uno de los factores determinantes para la inclusión en los grupos de SM.

El número de criterios positivos para SM es más elevado en el grupo SM sin NAFLD debido a una mayor presencia de trastornos del metabolismo hidrocarbonado y niveles bajos de HDL-Colesterol. En el grupo sin SM las bajas tasas de HTA y niveles bajos de HDL-Colesterol (inferiores al 8%) son claros determinantes de la ausencia de cuadro metabólico.

La coexistencia e influencia recíproca de todos estos factores de riesgo evaluados en nuestro trabajo, podrían consolidar al síndrome metabólico como un proceso dinámico interrelacionado con diferentes influencias de cada uno de estos factores.

Cambiando de enfoque, en el análisis de los resultados obtenidos en las variables relacionadas con NAFLD, podemos destacar que hasta el 62.5% del global de nuestra población a estudio presenta un perfil hepático en rango normal. Este dato es discretamente inferior al reportado en la literatura que lo sitúa en torno al 80%, independientemente de si se trata de una esteatosis simple o una esteatohepatitis. (7) Es el grupo SM sin NAFLD el que presenta cifras normales de transaminasas con mayor frecuencia (90%). La presencia de SM y NAFLD se asocia a un patrón de transaminasas alterado de manera más frecuente que en los sujetos con NAFLD sin SM. Por tanto, la presencia de SM parece conferir una mayor tasa de afectación de las enzimas hepáticas en los pacientes con NAFLD.

Tras el patrón normal, el perfil mixto de transaminasas es el más frecuente en nuestro estudio, presente en el 28% de los individuos SM y NAFLD. Al hilo de lo anterior, podría proponerse un razonable nexo de influencia entre IMC, masa grasa y un patrón mixto de transaminasas.

En la ecografía abdominal, los sujetos con SM y NAFLD presentaron un patrón de esteatosis severa en mayor porcentaje que los NAFLD sin SM (32% vs 7.7%). Por otra parte, los estadios más leves de esteatosis parecen ser más habituales en los sujetos con NAFLD sin SM (61.5% vs 48%)

La situación de transaminasas normales es más frecuente en sujetos con ecografía normal o esteatosis leve/moderada, mientras que en los casos de esteatosis grave sólo hay un 10% de individuos con enzimas hepáticas normales. Así, los marcadores hepáticos alterados pueden traducir estadios clínicamente más avanzados en el acúmulo de grasa a nivel hepático.

A la vista de los resultados, el síndrome metabólico parece predisponer la progresión en la historia natural de NAFLD.

Los resultados experimentales con la técnica de OWLIver Test deberían establecer el “gold estándar” de clasificación pronóstica en el cuadro de NAFLD. En nuestra serie, de forma global, se ha identificado un 6.3% de sujetos con NASH, un 75% de pacientes con NAFLD y tan sólo un 18.8% de los individuos con resultados de normalidad. Esto pone de manifiesto que existen formas de presentación de la enfermedad que no se transcriben fácilmente a los criterios fenotípicos clásicos de NAFLD y SM.

La ecografía detecta realmente un 81.6% de los casos existentes de NAFLD mientras que la normalidad de la misma sólo descarta el cuadro en un 20% de los casos, ya que el 80% de los sujetos con ecografía normal han resultado positivos en el test OWLIver. De esta forma, llevar a cabo la determinación analítica de OWLIver Test puede condicionar la detección de casos que fenotípicamente no son demostrables mediante ecografía, tratándose de cuadros clínicos precoces o variantes fenotípicas diferentes.

En el 18.4% de los casos el patrón ecográfico de NAFLD no se ve respaldado por el OWLIver Test, aunque ninguno de los mismos corresponde con estadio NASH.

En referencia a los resultados del patrón de transaminasas, existe hasta un 76.7% de sujetos con transaminasas normales que muestran un resultado positivo en OWLIver Test, lo cual estaría en relación con patrones subclínicos o variantes fenotípicas diferentes al igual que ocurría con los resultados obtenidos de la ecografía abdominal. También hemos hallado un 11.1% de sujetos con transaminasas alteradas que presentan un resultado de OWLIver Test negativo, indicando la posibilidad de otra causa como origen de la alteración analítica.

En los pacientes con SM hay un 80% de resultados positivos del OWLiver Test y en el grupo sin SM el porcentaje es del 84.6% de los casos. De esta forma, la presencia o no de SM no parece influir en el resultado del OWLiver Test.

La metabolómica aplicada a este campo a través de OWLiver Test tiene el potencial de proporcionar una nueva herramienta de diagnóstico de NAFLD (141) (142) que nos ayude a comparar los perfiles de distintos fenotipos en relación con los cambios metabólicos asociados a éstos. Podemos destacar que el rol específico de este nuevo elemento diagnóstico se centra en la evaluación de casos no detectados con la estratificación clínico-analítica habitualmente utilizada, pudiendo ayudar a una correcta clasificación de los individuos y por tanto, al acceso precoz a opciones terapéuticas.

El valor diagnóstico como “gold estándar” de la técnica también nos puede plantear la necesidad de realizar estudios prospectivos para evaluar su papel en la progresión de NAFLD y las posibles influencias de otros factores asociados como la presencia o no de SM. En nuestro caso no se muestra un patrón diferencial en la presencia o no de SM aunque la limitación en el número de pacientes y el diseño del estudio puede ser un condicionante importante en estos resultados.

Dentro de los factores ambientales condicionantes en el desarrollo del cuadro metabólico, el patrón de dieta y la actividad física son los dos aspectos más relevantes. (262)

La evaluación del patrón de dieta mediterránea en el conjunto global de la población muestra una baja adherencia, fundamentalmente por la limitación en el consumo de ≥ 2 raciones de verdura/día (37.5%), ≥ 3 piezas de fruta/día (48%) y ≥ 3 raciones de legumbres/semana (31.3%).

Se observa mayor adherencia a recomendaciones como el consumo de aceite de oliva (93.8%), la limitación a menos de 1 ración de carne roja al día (83.3%) o el consumo de mantequilla (83.3%).

Las diferencias fundamentales entre los grupos analizados hacen referencia a una mayor adherencia en el grupo de SM sin NAFLD, donde destaca un mayor consumo de aceite de oliva (100%), de pescado (60%) y un menor consumo de repostería industrial.

Los sujetos con SM y NAFLD parecen mostrar una tendencia a un peor patrón de adherencia a la dieta mediterránea respecto a SM sin NAFLD,

centrados, sobre todo en un consumo mayor de carnes rojas frente a carnes magras, un mayor consumo de bebidas carbonatadas así como de repostería industrial. Este punto abre la posibilidad de realizar políticas de intervención más agresivas para mejorar la estructura de hábitos de estos pacientes con mayor grado de complejidad clínica y, por tanto, mayor riesgo cardiovascular asociado. En este grupo de alto riesgo, la intervención dietética puede mejorar los resultados cardiovasculares a largo plazo de forma independiente. **(266)**

Finalmente, en cuanto al patrón de ingesta, podemos comentar que el consumo de vino ≥ 3 vasos/semana es mayor en el grupo de SM sin NAFLD (30%) frente a un 8% en SM y NAFLD y un 15% en NAFLD sin SM. En este sentido, la prohibición del consumo de alcohol en pacientes con NAFLD es una causa limitante de la adherencia al patrón de dieta mediterránea.

En relación a los resultados globales publicados en la literatura referentes a los beneficios de la dieta mediterránea (Predimed), podemos referir que el aceite de oliva se utiliza de forma mayoritaria en el global de la población estudiada, aunque la cantidad de aceite no alcanza las recomendaciones de consumo elevado en relación a la limitación de grasa en estos sujetos con IMC elevado.

Las recomendaciones de consumo de frutos secos como fuente de antioxidantes y factores de protección cardiovascular tienen un menor seguimiento en esta población (48%), sin diferencias significativas entre grupos. Esta potencial área de mejora en cuanto a la adherencia a la dieta mediterránea podría tener interés terapéutico en esta población.

De forma global, la actividad física en nuestros sujetos a estudio se encuentra muy limitada, existiendo un porcentaje elevado de sujetos con baja actividad física ≤ 150 min/semana (45.8%), lo cual supone una limitación terapéutica importante.

La mayor parte del tiempo dedicado a la actividad física se distribuye entre ejercicios de intensidad ligera a moderada (86%) frente a actividad intensa (14%).

Como referimos previamente, los sujetos con SM sin NAFLD presentan un mayor porcentaje de ejercicio físico (60% vs 52% en SM y NAFLD vs 53.8% en NAFLD sin SM), entendiendo éste como aquella actividad física que se practica ≥ 150 min/semana.

Es interesante señalar el hecho de que a pesar de tener un menor porcentaje de sujetos que practican alguna actividad física ≥ 150 min/semana, el grupo NAFLD sin SM es el que presenta un menor número de horas sentado (18.8 horas/semana vs 22.8 horas/semana en SM y NAFLD vs 25.5 horas/semana en SM sin NAFLD). Se ha insistido en la íntima asociación entre un estilo de vida sedentario con la aparición de SM, por lo que nuestros resultados avalan la evidencia científica.

La intervención en ejercicio físico en esta población ofrece un amplio margen terapéutico en cuanto a reducción de las horas de sedentarismo y aumento de la duración e intensidad de ejercicio físico realizado.

Debemos destacar que la intervención en dieta y ejercicio constituye la base del control del SM y, por tanto, un factor fundamental en la actuación preventiva dirigida al NAFLD.

El estudio del patrón de microbiota intestinal en los fenotipos descritos mostró diferencias en el RQ (abundancia relativa) de firmicutes, siendo mayor en pacientes con NAFLD y SM frente a los que no tienen SM pero sí NAFLD. Clásicamente este incremento está descrito en la literatura en relación con la obesidad. Sin embargo, en nuestra serie no existen diferencias antropométricas significativas entre grupos. Así, otros factores como la inflamación hepática o la presencia de SM pueden ser factores que condicionen este aumento relativo de Firmicutes. El fenotipo con perfil menos favorable; es decir, con mayor RQ, sería el paciente con NAFLD y SM, mientras que el fenotipo más favorable serían los pacientes que aún presentando NAFLD, ésta no está asociado a SM. Con el diseño del estudio no podemos establecer una asociación causal entre los factores inflamatorios de hígado, síndrome metabólico y este patrón microbiano.

En el caso de los Bacteroidetes, se muestra una tendencia a una mayor RQ en pacientes sin NAFLD frente a los otros dos grupos con ésta, aunque sin diferencias estadísticamente significativas. En la literatura se destaca un aumento de bacteroidetes en relación con hábitos de dieta rica en grasa y proteínas, diferencia que no hemos encontrado en nuestra población.

En relación con la diabetes, está descrito un descenso de bacteroidetes que no se ha evidenciado en nuestra serie.

El hallazgo de la correlación entre los filos de Firmicutes y Bacteroidetes en nuestra serie está ampliamente descrito en la literatura y apoya el hecho de que el conjunto del ecosistema de la microbiota es la resultante final de los diferentes factores influyentes en la misma.

La ecografía abdominal es una de las pruebas diagnósticas de mayor importancia en la valoración clínica de la afectación hepática de los pacientes con NAFLD, sin embargo, en nuestro trabajo no hemos encontrado ninguna asociación entre el patrón de microbiota y la presencia o severidad del patrón de esteatosis hepática. En algunos trabajos de la literatura los cambios inflamatorios en el hígado están relacionados con el patrón ecográfico. Existen nuevas técnicas como la desarrollada en nuestro trabajo, OWLiver Test, que tratan de perfilar el patrón de afectación hepática grasa. No hemos hallado ninguna relación entre los resultados de OWLiver Test y los patrones de microbiota.

La presencia o no de inflamación hepática probablemente esté más relacionada con cambios en la permeabilidad de la barrera intestinal que con cambios en los patrones de filos encontrados.

En relación al patrón de alimentación, explorado según los diferentes puntos de adherencia a la dieta mediterránea, no se han encontrado diferencias significativas con la microbiota. Así, el mayor consumo de aceite de oliva, la presencia de alcohol o la limitación de repostería industrial y grasas, no se ha asociado a diferencias en la RQ de firmicutes o bacteroidetes.

En esta población, de predominio sedentario y con alta prevalencia de factores de riesgo cardiometabólicos, la realización de actividad física (más de 150 min/semana) no se ha asociado a cambios en la microbiota.

Probablemente, existan otros factores independientes a la dieta, ejercicio y presencia o no de DM u obesidad, que condicionan cambios en la población bacteriana de nuestra flora intestinal.

Para finalizar debemos hacer referencia las limitaciones del estudio referidas a la muestra, posibles interferencias en las determinaciones, etc., que hacen que nuestros resultados precisen estudios posteriores que reafirmen los hallazgos encontrados y den paso a confirmar las hipótesis planteadas en esta discusión.

6. Conclusiones

6. Conclusiones

- ✓ Los pacientes con Enfermedad Hepática Grasa no Alcohólica presentan como constante, un perímetro de la cintura de riesgo, menor masa libre de grasa y menor impedancia bioeléctrica, que traducen un peor perfil antropométrico.
- ✓ En el grupo de Síndrome Metabólico sin Enfermedad Hepática Grasa no Alcohólica destaca la presencia de los componentes de Síndrome Metabólico relacionados con la elevación de los niveles de glucosa y el descenso de HDL-Colesterol. En los casos de Enfermedad Hepática Grasa no Alcohólica sin Síndrome Metabólico destaca los mayores niveles de HDL-Colesterol junto con una baja tasa de hipertensión arterial asociada.
- ✓ La combinación de Síndrome Metabólico y Enfermedad Hepática Grasa no Alcohólica parece conferir un peor patrón de enzimas hepáticas y de severidad ecográfica respecto a los pacientes sin Síndrome Metabólico.
- ✓ Los resultados de OWLiver Test identifican un mayor porcentaje de individuos afectados (6.3% Esteatohepatitis No Alcohólica y 75% Enfermedad Hepática Grasa no Alcohólica) frente a las técnicas clásicas.
- ✓ El 80% de los sujetos con ecografía normal han resultado positivos en el test OWLiver, detectando por tanto casos que fenotípicamente no son demostrables mediante ecografía. En el 18.4% de los casos el patrón ecográfico de Enfermedad Hepática Grasa no Alcohólica no se ve respaldado por el OWLiver Test, aunque ninguno de los mismos corresponde con estadio Esteatohepatitis No Alcohólica.
- ✓ La alteración de las enzimas hepáticas en relación con OWLiver Test, no resultan especialmente útiles en la identificación o descarte de casos de afectación hepática grasa.

- ✓ La presencia o no de Síndrome Metabólico no parece influir en el resultado del OWLIver Test.
- ✓ Los sujetos con Síndrome Metabólico y Enfermedad Hepática Grasa no Alcohólica parecen mostrar una tendencia a un peor patrón de adherencia a la dieta mediterránea respecto a Síndrome Metabólico sin Enfermedad Hepática Grasa no Alcohólica, centrados, sobre todo en un consumo mayor de carnes rojas frente a carnes magras, un mayor consumo de bebidas carbonatadas así como de repostería industrial.
- ✓ La actividad física está muy limitada en toda la población a estudio, especialmente entre los sujetos Síndrome Metabólico y Enfermedad Hepática Grasa no Alcohólica.
- ✓ En el global de la muestra estudiada, existe una correlación inversa entre los filos bacterianos de firmicutes y bacteroidetes.
- ✓ Hemos encontrado diferencias en las poblaciones de Firmicutes entre algunos de los fenotipos estudiados, sin diferencias en el grado de obesidad de estas poblaciones, siendo mayor la abundancia relativa de éstos en paciente con Síndrome Metabólico y Enfermedad Hepática Grasa no Alcohólica frente a los pacientes con Enfermedad Hepática Grasa no Alcohólica sin Síndrome Metabólico.
- ✓ No existen diferencias entre los filos de microbiota en relación con el resultado de OWLIver Test, ni con la antropometría, ni con la bioquímica, ni con patrón de alimentación o ejercicio.

7. Bibliografía

7. Bibliografía

1. Sheth SG, Gordon FD, Chopar S. Nonalcoholic steatohepatitis. *Ann Intern Med.* 1997;126:137-145.
2. Ludwig J, Viggiano RT. Nonalcoholic steatohepatitis. Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc.* 1980;55:34-8.
3. Younossi ZM, Stepanova M, Afendy M, et al. Changes in the prevalence of the most common causes of chronic liver diseases in the United States from 1988 to 2008. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2011;9:524-530.
4. Blachier M, Leleu H, Peck-Radosavljevic M, Valla DC, Roudot-Thoraval F. The burden of liver disease in Europe. A Review of available epidemiological data. European Association for the Study of the Liver 2013. *J Hepatol.* 2013;58:593-608.
5. Caballería L, Pera G, Auladell MA, et al. Prevalence and factors associated with the presence of nonalcoholic fatty liver disease in an adult population in Spain. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2010;22:24-32.
6. Fabbrini E, Sullivan S, Klein S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic and clinical implications. *Hepatology.* 2010;51:679-89.
7. Wilfred de Alwis NM, Day CP. Non-alcoholic fatty liver disease: the mist gradually clears. *J Hepatol.* 2008;48:S104-12.
8. Assy N, Kaita K, Mymin D, Levy C, Rosser B, Minuk G. Fatty infiltration of liver in hyperlipidemic patients. *Dig Dis Sci.* 2000;45:1929-1934.
9. Salamone F, Bugianesi E. Nonalcoholic fatty liver disease: the hepatic trigger of the metabolic syndrome. *J Hepatol.* 2010;53:1146-7.
10. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non alcoholic fatty liver disease and non alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011;34:274-285.
11. Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology.* 2006;43:S99-S112.
12. Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. *Am J Gastroenterol.* 2003;98:960-967.
13. Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Castiglione A, Croce LS, Tiribelli C, et al. Incidence and natural course of fatty liver in the general population: the Dionysos study. *Hepatology.* 2007;46:1387-1391.
14. Haring R, Wallaschofski H, Nauck M, Dorr M, Baumeister SE, Volzke H. Ultrasonographic hepatic steatosis increases prediction of mortality risk from elevated serum gamma-glutamyl transpeptidase levels. *Hepatology.* 2009;50:1403-1411.
15. Williams CD, Stengel J, Asike MI, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology.* 2011;140:124-31.
16. Ruhl CE, Everhart JE. Determinants of the association of overweight with elevated serum alanine aminotransferase activity in the United States. *Gastroenterology.* 2003;124:71-9.
17. Ioannou GN, Boyko EJ, Lee SP. The prevalence and predictors of elevated serum aminotransferase activity in the United States in 1999-2002. *Am J Gastroenterol.* 2006;101:76-82.
18. Patt CH, Yoo HY, Dibadj K, Flynn J, Thuluvath PJ. Prevalence of transaminase abnormalities in asymptomatic, healthy subjects participating in an executive health-screening program. *Dig Dis Sci.* 2003;48:797-801.

19. Piton A, Poynard T, Imbert-Bismut F, et al. Factors associated with serum alanine transaminase activity in healthy subjects: consequences for the definition of normal values, for selection of blood donors, and for patients with chronic hepatitis C. MULTIVIRC Group. *Hepatology*. 1998;27:1213–9.
20. Kariv R, Leshno M, Beth-Or A, et al. Re-evaluation of serum alanine aminotransferase upper normal limit and its modulating factors in a large-scale population study. *Liver Int*. 2006;26:445–50.
21. Amarapurkar DN, Patel ND. Clinical spectrum and natural history of non-alcoholic steatohepatitis with normal alanine aminotransferase values. *Trop Gastroenterol*. 2004;25:130–4.
22. Powell EE, et al. Steatosis: co-factor in other liver diseases. *Hepatology*. 2005;42:5.
23. Amarapurkar A, Ghansar T. Fatty liver: experience from western India. *Ann Hepatol*. 2007;6:37–40.
24. Lee JY, Kim KM, Lee SG, et al. Prevalence and risk factors of non-alcoholic fatty liver disease in potential living liver donors in Korea: a review of 589 consecutive liver biopsies in a single center. *J Hepatol*. 2007;47:239–44.
25. Marcos A, Fisher RA, Ham JM, et al. Selection and outcome of living donors for adult to adult right lobe transplantation. *Transplantation*. 2000;69:2410–5.
26. Bedogni G, Bellentani S, Miglioli L, et al. The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterol*. 2006;6:33.
27. Bedogni G, Kahn HS, Bellentani S, Tiribelli C. A simple index of lipid over-accumulation is a good marker of liver steatosis. *BMC Gastroenterol*. 2010;10:98.
28. Wanless IR, Lentz JS. Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors. *Hepatology*. 1990;12:1106–10.
29. Halon A, Patrzalek D, Rabczynski J. Hepatic steatosis in liver transplant donors: rare phenomenon or common feature of donor population? *Transpl Proc*. 2006;38:193–195.
30. Yamamoto K, Takada Y, Fujimoto Y, et al. Nonalcoholic steatohepatitis in donors for living donor liver transplantation. *Transplantation*. 2007;83:257–262.
31. Clemente G, García C. Estado actual de la esteatohepatitis no alcohólica. *Med Clin (Barc)*. 2003;121:102–108.
32. Sanyal AJ. AGA technical review of nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2002;123:1705–1725.
33. Agrawal S, Bonkovsky HL. Management of nonalcoholic steatohepatitis: an analytic review. *J Clin Gastroenterol*. 2002;35:253–261.
34. Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology*. 2003;37:1202–19.
35. Chitturi S, Farrell GC. Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liv Dis*. 2001;21:27–41.
36. Diehl AM. Nonalcoholic steatohepatitis pathogenesis. En: *Progress in the treatment of liver diseases*. Arroyo V, Forns X, García-Pagán JC, editors. Barcelona: Ars Medica, 2003;227–32.
37. Day CP, James OFW. Steatohepatitis: a tale of two «hits»? *Gastroenterology*. 1998;114:842–5.
38. Harrison SA, Di Bisceglie AM. Advances in the understanding and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Drugs*. 2003;63:2379–94.
39. Roche HM. Dietary lipids and gene expression. *Biochem Soc Trans*. 2004;32(Pt 6):999–1002.

40. Musso G, Gambino R, De Michieli F, Cassader M, Rizzetto M, Durazzo M, et al. Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2003;37:909-16.
41. Bocher V, Pineda-Torra I, Fruchart JC, Staels B. PPARs: Transcription factors controlling lipid and lipoprotein metabolism. *Ann NY Acad Sci*. 2002;967:7-18.
42. Ameen C, Edvardsson U, Ljungberg A, Asp L, Akerblad P, Tuneld A, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha increases the expression and activity of microsomal triglyceride transfer protein in the liver. *J Biol Chem*. 2005;280:1224-9.
43. Linden D, Lindberg K, Oscarsson J, Claesson C, Asp L, Li L, et al. Influence of peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists on the intracellular turnover and secretion of apolipoprotein (Apo) B-100 and ApoB-48. *J Biol Chem*. 2002;277:23044-53.
44. Sekiya M, Yahagi N, Matsuzaka T, Najima Y, Nakakuki M, Nagai R, et al. Polyunsaturated fatty acids ameliorate hepatic steatosis in obese mice by SREBP-1 suppression. *Hepatology*. 2003;38:1529-39.
45. Sanyal AJ. Insulin resistance and nonalcoholic steatohepatitis: fat or fiction. *Am J Gastroenterol*. 2001;96:274-6.
46. Harrison SA, Diehl AM. Fat and the liver: a molecular overview. *Semin Gastrointest Dis*. 2002;13:3-16.
47. Bugianesi E, Zannoni C, Vanni E, Marzocchi R, Marchesini G. Non-alcoholic fatty liver and insulin resistance: a cause-effect relationship? *Dig Liver Dis*. 2004;36:165-73.
48. Havel PJ. Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism. *Diabetes*. 2004;53Supl 1:143-51.
49. Miner JL. The adipocyte as an endocrine cell. *J Anim Sci*. 2004;82:935-41.
50. Faraj M, Lu HL, Cianflone K. Diabetes, lipids, and adipocyte secretagogues. *Biochem Cell Biol*. 2004;82:170-90.
51. Bray GA. Medical consequences of obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:2583-9.
52. Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, Giacca A. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev*. 2002;23:201-29.
53. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet*. 1963;1:785-9.
54. De Almeida IT, Cortez-Pinto H, Fidalgo G, Rodrigues D, Camilo ME. Plasma total and free fatty acids composition in human non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Nutr*. 2002;21:219-23.
55. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*. 2005;115:1343-51.
56. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest*. 2004;114:147-52.
57. Petersen KF, Befroy D, Dufour S, Dziura J, Ariyan C, Rothman DL, et al. Mitochondrial dysfunction in the elderly: Possible role in insulin resistance. *Science*. 2003;300:1140-2.
58. Abu-Elheiga L, Brinkley WR, Zhong L, Chirala SS, Woldegiorgis G, Wakil SJ. The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:1444-9.

59. McGarry JD, Mannaerts GP, Foster DW. A posible role for malonyl-CoA in the regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis. *J Clin Invest.* 1977;60:265–70.
60. Chisholm JW, Hong J, Mills SA, Lawn RM. The LXR ligand T0901317 induces severe lipogenesis in the db/db diabetic mouse. *J Lipid Res.* 2003;44:2039–48.
61. Yoshikawa T, Ide T, Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Matsuzaka T, et al. Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and liver X receptor (LXR) in nutritional regulation of fatty acid metabolism. I. PPARs suppress sterol regulatory element binding protein-1c promoter through inhibition of LXR signaling. *Mol Endocrinol.* 2003;17:1240–54.
62. Ide T, Shimano H, Yoshikawa T, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Matsuzaka T, et al. Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and liver X receptor (LXR) in nutritional regulation of fatty acid metabolism. II. LXRs suppress lipid degradation gene promoters through inhibition of PPAR signaling. *Mol Endocrinol.* 2003;17:1255–67.
63. Hardie DG. Minireview: The AMP-activated proteinkinase cascade: The key sensor of cellular energy status. *Endocrinology.* 2003;144:5179–83.
64. Dobrzyn P, Dobrzyn A, Miyazaki M, Cohen P, Asilmaz E, Hardie DG, et al. Stearoyl-CoA desaturase-1 deficiency increases fatty acid oxidation by activating AMP-activated proteinkinase in liver. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101:6409–14.
65. Hardie DG, Scott JW, Pan DA, Hudson ER. Management of celular energy by the AMPactivated proteinkinase system. *FEBS let.* 2003;546:113–20.
66. Kawaguchi T, Takenoshita M, Kabashima T, Uyeda K. Glucose and cAMP regulate the L-type pyruvate kinase gene by phosphorylation/dephosphorylation of the carbohydrate response element binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:13710–5.
67. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest.* 2001;108:1167–74.
68. Fryer LG, Parbu-Patel A, Carling D. The antidiabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways. *J Biol Chem.* 2002;277:25226–32.
69. Saha AK, Avilucea PR, Ye JM, Assifi MM, Kraegen EW, Ruderman NB. Pioglitazone treatment activates AMP-activated protein kinase in rat liver and adipose tissue in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;314:580–5.
70. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Zoli M, Melchionda N. Metformin in nonalcoholic steatohepatitis. *Lancet.* 2001;358:893–4.
71. Neuschwander-Tetri BA, Brunt EM, Wehmeier KR, Oliver D, Bacon BR. Improved nonalcoholic steatohepatitis after 48 weeks of treatment with the PPAR-gamma ligand rosiglitazone. *Hepatology.* 2003;38:1006–17.
72. Promrat K, Lutchman G, Uwaifo GI, Freedman RJ, Soza A, Heller T, et al. A pilot study of pioglitazone treatment for nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2004;39:188–96.
73. Javor ED, Ghany MG, Cochran EK, Oral EA, De Paoli AM, Premkumar A, et al. Leptin reverses nonalcoholic steatohepatitis in patients with severe lipodystrophy. *Hepatology.* 2005;41:753–60.
74. Shimomura I, Hammer RE, Ikemoto S, Brown MS, Goldstein JL. Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature.* 1999;401:73–6.

75. Chitturi S, Farrell GC, Frost L, Kriketos A, Lin R, Fung C, et al. Serum leptin NASH correlates with hepatic steatosis but not fibrosis: A manifestation of lipotoxicity? *Hepatology*. 2002;36:403–9.
76. Angulo P, Alba LM, Petrovic LM, Adams LM, Lindor KD, Jensen MD. Leptin, insulin resistance, and liver fibrosis in human nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2004;41:943–9.
77. Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin. *Hepatology*. 2004;40:46–54.
78. Kaser S, Moschen A, Cayon A, Kaser A, Crespo J, Pons-Romero F, et al. Adiponectin and its receptors in non-alcoholic steatohepatitis. *Gut*. 2005;54:117–21.
79. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito T, Waki H, Uchida S, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acidoxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med*. 2002;8:1288–95.
80. Masaki T, Chiba S, Tatsukawa H, Yasuda T, Noguchi H, Seike M, et al. Adiponectin protects LPS-induced liver injury through modulation of TNF-alpha in KK-Ay obese mice. *Hepatology*. 2004;40:177–84.
81. Feldstein AE, Canbay A, Angulo P, Taniai M, Burgart LJ, Lindor KD, et al. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*. 2003;125:437–43.
82. Lieber CS. CYP2E1: from ASH to NASH. *Hepatol. Res* 2004;28:1-11.
83. Weltman MD, Farrell GC, Hall P, Ingelman-Sundberg M, Liddle C. Hepatic cytochrome P450 2E1 is increased in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 1998;27:128-33.
84. Schattenberg JM, Wang Y, Singh R, Rigoli RM, Czaja MJ. Hepatocyte CYP2E1 overexpression and steatohepatitis lead to impaired hepatic insulin signaling. *J Biol Chem*. 2005;280:9887-9894.
85. Pessayre D, Berson A, Fromenty B, Mansouri A. Mitochondria in steatohepatitis. *Semin Liv Dis*. 2001;21:57-69.
86. Fan CY, Pan J, Usuda N, Yeldandi AV, Rao MS, Reddy JK. Steatohepatitis, spontaneous peroxisome proliferation and liver tumors in mice lacking peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase: implications for peroxisome proliferator-activated receptor alpha natural ligand metabolism. *J Biol Chem*. 1998;273:15639-15645.
87. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med*. 2002;346:1221-31.
88. Mataix J, Battino M. Estrés oxidativo. En: Mataix Verdú J, editor. *Nutrición y alimentación humana. II. Situaciones fisiológicas y patológicas*. Madrid: Ergon, 2002;1047-63.
89. Mehta K, Van Thiel DH, Shah N, Mobarhan S. Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and the role of antioxidants. *Nutrition Rev*. 2002;60:289-93.
90. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*. 1991;11:81-28.
91. Albano E, Mottaran E, Vidali M, Reale E, Saksena S, Occhino G, et al. Immune response towards lipid peroxidation products as a predictor of progression of non-alcoholic fatty liver disease to advanced fibrosis. *Gut*. 2005;54:987–93.
92. Cortez-Pinto H, Carneiro de Moura M, Day CP. Non-alcoholic steatohepatitis: From cell biology to clinical practice. *J Hepatol*. 2006;44:197–208.
93. Tilg H, Diehl AM. Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med*. 2000;343:1467-76.

94. Leclercq IA, Farrell GC, Field J, Bell DR, González FJ, Robertson GR. CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest*. 2000;105:1067–75.
95. Emery MG, Fisher JM, Chien JY, Kharasch ED, Dellinger EP, Kowdley KV, et al. CYP2E1 activity before and after weight loss in morbidly obese subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2003;38:428–35.
96. Seki S, Kitada T, Yamada T, Sakaguchi H, Nakatani K, Wakasa K. In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty liver diseases. *J Hepatol*. 2002;37:56–62.
97. Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li Z-W, Lond JM, et al. IKK-b links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med*. 2005;11:191–8.
98. Crespo J, Cayón A, Fernández-Gil P, Hernández-Guerra M, Mayorga M, Domínguez-Díaz E, et al. Gene expression of TNF alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in non- alcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology*. 2001;34:1158–63.
99. Inayat-Hussain SH, Couet C, Cohen GM, Cain K. Processing/activation of CPP32-like proteases is involved in transforming growth factor β 1-induced apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology*. 1997;25:1516-26.
100. Leonarduzzi G, Scavazza A, Biasi F, Chiarpotto E, Camandola S, Vogel S, et al. The lipid peroxidation end product 4-hydroxy-2,3-nonenal up-regulates transforming growth factor b1 expression in the macrophage lineage: a link between oxidative injury and fibrosclerosis. *FASEB J*. 1997;11:851-7.
101. Ron D. Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *J Clin Invest*. 2002;110:1383–8.
102. Hidvegi T, Schmidt B, Hale P, Perlmutter DH. Accumulation of mutant α -1 ATZ in the ER activates caspases -4 and -12, NF- κ B and BAP31 but not the unfolded protein response. *J Biol Chem*. 2005;280:39002–15.
103. Hug H, Strand S, Grambihler A, Galle J, Hack V, Stremmel W, et al. Reactive oxygen intermediates are involved in the induction of CD95 ligand mRNA expression by cytostatic drugs in hepatoma cells. *J Biol Chem*. 1997;272:28191-3.
104. Pessayre D, Haouzi D, Fau D, Robin MA, Mansouri A, Berson A. Withdrawal of life support, altruistic suicide, fratricidal killing, and euthanasia by lymphocytes: different forms of drug-induced hepatic apoptosis. *J Hepatol*. 1999;31:760-70.
105. Vendemiale G, Grattagliano I, Caraceni P, Caraccio G, Domenicale M, Dall'Agata M, et al. Mitochondrial oxidative injury and energy metabolism alteration in rat fatty liver: effect of the nutritional status. *Hepatology*. 2001;33:808-15.
106. Koruk M, Taysi S, Savas MC, Yilmaz O, Akcay F, Karakok M. Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Ann Clin Lab Sci*. 2004;34:57-62.
107. Soga SF, Diehl A. Non-alcoholic fatty liver disease: lumen-liver interactions and possible role for probiotics. *J Hepatol*. 2003;38:681-687.
108. Nair S, Cope K, Risby TH, Diehl AM, Terence RH. Obesity and female gender increase breath ethanol concentration: potential implications for the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol*. 2001;96:1200-04.
109. Nazim M, Stamp G, Hodgson HJ. Non-alcoholic steatohepatitis associated with small intestinal diverticulosis and bacterial overgrowth. *Hepatogastroenterology*. 1988;36:349-51.

- 110.** Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology*. 1999;116:1413-9.
- 111.** Washington K, Wright K, Shyr Y, Hunter EB, Olson S, Raiford DS. Hepatic stellate cell activation in nonalcoholic steatohepatitis and fatty liver. *Hum Pathol*. 2000;31:822-8.
- 112.** Parola M, Pinzani M, Casini A, Albato E, Poli G, Gentilini A, et al. Stimulation of lipid peroxidation or 4-hydroxynonenal treatment increases procollagen $\alpha 1(1)$ gene expression in human liver fat-storing cells. *Biochem Biophys Res Comm*. 1993;194:1044-50.
- 113.** Bedossa P, Houghlum K, Trautwein C, Holstege A, Chojkier M. Stimulation of collagen alpha 1 (1) gene expression is associated with lipid peroxidation in hepatocellular injury: a link to tissue fibrosis? *Hepatology*. 1994;19:1262-71.
- 114.** Bataller R, Schwabe RF, Choi YH, Yang L, Paik YH, Lindquist J, et al. NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. *J Clin Invest*. 2003;112:1383-94.
- 115.** Oben JA, Roskams T, Yang S, Lin H, Sinelli N, Li Z, et al. Norepinephrine induces hepatic fibrogenesis in leptin deficient ob/ob mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;308:284-92.
- 116.** Paradis V, Perlemuter G, Bonvoust F, Dargere D, Parfait B, Vidaud M, et al. High glucose and hyperinsulinemia stimulate connective tissue growth factor expression: A potential mechanism involved in progression to fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2001;34:738-44.
- 117.** Vuppalanchi R, Chalasani N. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis: selected practical issues in their evaluation and management. *Hepatology*. 2009;49:306-17.
- 118.** Rashid M, Roberts EA. Nonalcoholic steatohepatitis in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2000;30:48-53.
- 119.** Arslan N, Büyükgebiz B, Öztürk Y, et al. Fatty liver in obese children: prevalence and correlation with anthropometric measurements and hyperlipidemia. *The Turkish Journal of Pediatrics*. 2005;47:23-27.
- 120.** Joseph AE, Saverymuttu SH, Al-Sam S, Cook MG, Maxwell JD. Comparison of liver histology and ultrasonography in assessing diffuse parenchymal liver disease. *Clin Radiol*. 1991;53:26-31.
- 121.** Yamada H, Ebara M, Yamaguchi T, Okabe S, Fukuda H, Yoshikawa M, Kishimoto T, Et al. A pilot approach for quantitative assessment of liver fibrosis using ultrasound: preliminary results in 79 cases. *J Hepatol*. 2006;44:68-75.
- 122.** Ryan CK, Johnson LA, Germin BI, Marcos A. One hundred consecutive hepatic biopsies in the workup of living donors for right lobe liver transplantation. *Liver Transpl*. 2002;8:1114-1122.
- 123.** Mottin CC, Moretto M, Padoin AV, Swarowsky AM, Toneto MG, Glock L, Repetto G. The role of ultrasound in the diagnosis of hepatic steatosis in morbidly obese patients. *Obes Surg*. 2004;14:635-637.
- 124.** Caballeria J, Rodés J. Esteatohepatitis no alcohólica. *Med Clin (Barc)*. 2003;120:670-5.
- 125.** Brunt EM, Tiniakos DG. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2010;16:5286-96.

126. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW et al. Desing and validation of a histologic scoring system for NAFLD. *Hepatology*. 2005;41:1313-1321.
127. Brunt EM, Janney CG, DiBisceglie AM, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol*. 1999;94:2467-74.
128. Palekar NA, Naus R, Larson SP, Ward J, Harrison SA. Clinical model for distinguishing nonalcoholic steatohepatitis from simple steatosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Liver Int*. 2006;26:151-6.
129. Shimada M, Kawahara H, Ozaki K, Fukura M, Yano H, Tsuchishima M, et al. Usefulness of a combined evaluation of the serum adiponectin level, HOMA-IR, and serum type IV collagen 7S level to predict the early stage of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol*. 2007;102:1931-8.
130. Campos GM, Bambha K, Vittinghoff E, Rabl C, Posselt AM, Ciofica R, et al. A clinical scoring system for predicting nonalcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients. *Hepatology*. 2008;47:1916-23.
131. Gambino R, Cassader M, Pagano G. Meta-analysis: Natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity. *Annals of Medicine*. 2011;43(8):617-49.
132. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, Charlton M, Sanyal AJ. The Diagnosis and Mangement of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology*. 2012;55(6):2005-23.
133. Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2003;38:518-26.
134. Terán-Lantarón A, Crespo-García J. Cribado de la enfermedad hepática por depósito de grasa: cómo y a quién. *Gastroenterol Hepatol*. 2011;34(4):278-288.
135. Guha IN, Parkes J, Roderick P, Chattopadhyay D, Cross R, Harris S, et al. Noninvasive markers of fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: validating the European Liver Fibrosis Panel and exploring simple markers. *Hepatology*. 2008;47:455-60.
136. Angulo P, Hui JM, Marchesini G, Bugianesi E, George J, Farrell GC, et al. The NAFLD fibrosis score:a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology*. 2007;45:846-54.
137. Feldstein AE, Wieckowska A, Lopez AR, Liu YC, Zein NN, McCullough AJ. Cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis:a multicenter validation study. *Hepatology*. 2009;50:1072-8.
138. Wong VWS, Wong GLH, Choi PCL, Chan AWH, Li MKP, Chan HY. Disease progression of non-alcoholic fatty liver disease: a prospective study with paired liver biopsies at 3 years. *Gut*. 2010;59:969-74.
139. Yoneda M, Mawatari H, Fujita K, Iida H, Yonemitsu K, Kato S, et al. High-sensitivity Creactive protein is an independent clinical feature of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and also of the severity of fibrosis in NASH. *J Gastroenterol*. 2007;42:573-82.
140. Yoneda M, Uchiyama T, Kato S, Endo H, Fujita K, Yoneda K, et al. Pentraxin3 is a novel marker for nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *BMC Gastroenterol*. 2008;8:53.
141. Nicholson JK, Connelly J, Lindon JC, Holmes E. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. *Nat. Rev. Drug Discovery*. 2002;1(2):153-61.

- 142.** Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*. 1999;29(11):1181–9.
- 143.** Heijne WH, Kienhuis AS, Van Ommen B, Stierum RH, Groten JP. Systems toxicology: applications of toxicogenomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics in toxicology. *Expert Rev. Proteomics*. 2005;2(5):767–80.
- 144.** Cantoni GL. Activation of methionine for transmethylation. *J Biol Chem*. 1951;189(2):745–754.
- 145.** Mato JM, Lu SC. Role of S-adenosyl-L-methionine in liver health and injury. *Hepatology*. 2007;45(5):1306–1312.
- 146.** Cano A, Buque X, Martinez-Una M, Aurrekoetxea I, Menor A, Garcia-Rodriguez JL, Lu SC, Martinez-Chantar ML, Mato JM, Ochoa B, Aspichueta P. Methionine adenosyltransferase 1A gene deletion disrupts hepatic very low-density lipoprotein assembly in mice. *Hepatology*. 2011;54(6):1975–1986.
- 147.** Martinez-Una M, Varela-Rey M, Cano A, Fernandez-Ares L, Beraza N, Aurrekoetxea I, Martinez-Arranz I, Garcia-Rodriguez JL, Buque X, Mestre D, et al. Excess S-adenosylmethionine reroutes phosphatidylethanolamine towards phosphatidylcholine and triglyceride synthesis. *Hepatology*. 2013;58:1296–1305.
- 148.** Jacobs RL, Van der Veen JN, Vance DE. Finding the balance: the role of S-adenosylmethionine and phosphatidylcholine metabolism in development of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2013;58:1207–1209.
- 149.** Avila MA, Garcia-Trevijano ER, Martinez-Chantar ML, Latasa MU, Perez-Mato I, Martinez-Cruz LA, del Pino MM, Corrales FJ, Mato JM. S-Adenosylmethionine revisited: its essential role in the regulation of liver function. *Alcohol*. 2002;27(3):163–7.
- 150.** Corrales FJ, Perez-Mato I, Sanchez Del Pino MM, Ruiz F, Castro C, Garcia-Trevijano ER, Latasa MU, Martinez-Chantar ML, Martinez-Cruz A, Avila MA, Mato JM. Regulation of mammalian liver methionine adenosyltransferase. *J Nutr*. 2002;132(8 Suppl):2377S–81S.
- 151.** Martinez-Chantar ML, Garcia-Trevijano ER, Latasa MU, Perez-Mato I, Sanchez del Pino MM, Corrales FJ, Avila MA, Mato JM. Importance of a deficiency in S-adenosyl-L-methionine synthesis in the pathogenesis of liver injury. *Am J Clin Nutr*. 2002;76(5):1177S–82S.
- 152.** Finkelstein JD. Metabolic regulatory properties of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine. *Clin Chem Lab Med*. 2007;45(12):694–9.
- 153.** Martinez-Chantar ML, Vazquez-Chantada M, Ariz U, Martinez N, Varela M, Luka Z, Capdevila A, Rodriguez J, Aransay AM, Matthiesen R, Yang H, Calvisi DF, Esteller M, Fraga M, Lu SC, Wagner C, Mato JM. Loss of the glycine N-methyltransferase gene leads to steatosis and hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology*. 2008;47(4):1191–9.
- 154.** Heady JE, Kerr SJ. Alteration of glycine N-methyltransferase activity in fetal, adult, and tumor tissues. *Cancer Res*. 1975;35(3):640–3.
- 155.** Chen SY, Lin JR, Darbha R, Lin P, Liu TY, Chen YM. Glycine N-methyltransferase tumor susceptibility gene in the benzo(a)pyrene-detoxification pathway. *Cancer Res*. 2004;64(10):3617–23.
- 156.** Gowda GA, Zhang S, Gu H, Asiago V, Shanaiah N, Raftery D. Metabolomics-based methods for early disease diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn*. 2008;8(5):617–33.

157. Kaddurah-Daouk R, Kristal BS, Weinshilboum RM. Metabolomics: a global biochemical approach to drug response and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2008;48:653–83.
158. Bass NM. Lipidomic dissection of nonalcoholic steatohepatitis: moving beyond foie gras to fat traffic. *Hepatology*. 2010;51(1):4–7.
159. Neuschwander-Tetri BA. Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: The central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology*. 2010;52(2):774–788.
160. Mato JM, Martinez-Chantar ML, Lu SC. Methionine metabolism and liver disease. *Annu Rev Nutr*. 2008;28:273–93.
161. Puri P, Wiest MM, Cheung O, Mirshahi F, Sargeant C, Min HK, Contos MJ, Sterling RK, Fuchs M, Zhou H, Watkins SM, Sanyal AJ. The plasma lipidomic signature of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2009;50(6):1827–38.
162. Alonso C, Mato, JM. (2014) Nonalcoholic fatty liver disease. In *Global Metabolic Profiling: Clinical Applications* (Nicholls, A., Theodoridis, G. and Wilson, I.D., eds), pp. 110–122, Future Science Ltd, doi:10.4155/ebo.13.392.
163. Barr J, Vázquez-Chantada M, Alonso C, Pérez-Cormenzana M, Mayo R, Galán A, Caballería J, et al. Liquid chromatography-mass spectrometry-based parallel metabolic profiling of human and mouse model serum reveals putative biomarkers associated with the progression of nonalcoholic fatty liver disease. *J Proteome Res*. 2010;9:4501-12.
164. Kotronen A, Seppanen-Laakso T, Westerbacka J, Kiviluoto T, Arola J, Ruskeepaa AL, Oresic M, Yki-Jarvinen H. Hepatic stearyl-CoA desaturase (SCD)-1 activity and diacylglycerol but not ceramide concentrations are increased in the nonalcoholic human fatty liver. *Diabetes*. 2009;58(1):203–8.
165. Kunos G, Osei-Hyiaman D. Endocannabinoids and liver disease. IV. Endocannabinoid involvement in obesity and hepatic steatosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008;294(5):G1101–4.
166. Barr J, Caballería J, Martínez-Arranz I, Domínguez-Díez A, Alonso C, Muntané J, Pérez-Cormenzana M, García-Monzón C, Mayo R, Martín-Duce A, Romero-Gómez M, Lo Iacono O, Tordjman J, Andrade RJ, Pérez-Carreras M, Le Marchand-Brustel Y, Tran A, Fernández-Escalante C, Arévalo E, García-Unzueta M, Clement K, Crespo J, Gual P, Gómez-Fleitas M, Martínez-Chantar ML, Castro A, Lu SC, Vázquez-Chantada M, Mato JM. Obesity-dependent metabolic signatures associated with nonalcoholic fatty liver disease progression. *J Proteome Res*. 2012 Apr 6;11(4):2521-32. doi: 10.1021/pr201223p. Epub 2012 Mar 15.
167. Cano A, Alonso C. Deciphering non-alcoholic fatty liver disease through metabolomics. *Biochem Soc Trans*. 2014;42(5):1447-52.
168. Angulo P. GI Epidemiology: non-alcoholic fatty liver disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2007;25(8):883-889.
169. Teli MR., James OFW., Burt AD, et al. The natural history of non-alcoholic fatty liver: a followup study. *Hepatology*. 1995;22:1714-19.
170. Dam-Larsen S., Franzmann M., Anderson IB, et al. Long term prognosis of fatty liver disease and death. *GUT*. 2004;53:750-55.
171. Powell EE, Cooksley WGE, Hanson RR, et al. The natural history of non-alcoholic fatty liver: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology*. 1990;11:74-80.
172. Hui JM, Kench JG, Chitturi S, et al. Long term outcomes of cirrhosis in nonalcoholic steatohepatitis compared with hepatitis C. *Hepatology*. 2003;35:1485-1493.

- 173.** Ratziu V, Bonyhay L, Di Martino V, Charlotte F. Survival, liver failure and hepatocellular carcinoma in obesity-related cryptogenic cirrhosis. *Hepatology*. 2003;35:1485-1493.
- 174.** Arena U, Vizzutti F, Corti G, Ambu S, Stasi C, Bresci S, et al. Acute viral hepatitis increases liver stiffness values measured by transient elastography. *Hepatology*. 2008;47(2):380-384.
- 175.** Caldwell SH, Crespo DM. The spectrum expanded: cryptogenic cirrhosis and the natural history of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2004;40:578-84.
- 176.** Browning JD, Kumar KS, Saboorian MH, Thiele DL. Ethnic differences in the prevalence of cryptogenic cirrhosis. *Am J Gastroenterol*. 2004;99:292-8.
- 177.** Bugianesi E, Leone N, Vanni E, Marchesini G, Brunello F, Carucci P, Musso A, De Paolis P, Capussotti L, Salizzoni M, Rizzetto M. Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2002;123:134-40.
- 178.** Hashimoto E, Yatsuji S, Tobari M, Taniai M, Torii N, Tokushige K, Shiratori K. Hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol*. 2009;44 Suppl 19:89-95.
- 179.** Smedile A, Bugianesi E. Steatosis and hepatocellular carcinoma risk. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2005;9:291-3.
- 180.** Takuma Y, Nouse K. Nonalcoholic steatohepatitis-associated hepatocellular carcinoma: our case series and literatura review. *World J Gastroenterol*. 2010;16:1436-41.
- 181.** Ascha MS, Hanounch IA, Lopez R, Tamimi TA, Feldstein AF, Zein NN. The incidence and risk factor of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2010;51:1972-1978.
- 182.** Yasui K, Hashimoto E, Komorizono Y, Koike S, Arli S, Imai Y, et al. Characteristics of patients with nonalcoholic steatohepatitis who develop hepatocellular carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2011;9:428-433.
- 183.** Angulo P, Keach JC, Batts KB, Independent predictors of liver cirrhosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 1999;30:1356-62.
- 184.** El-Serag HB, Tran T, Everhart JE. Diabetes increases the risk of crhonic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2004;126:460-468.
- 185.** Targher G, Day CP, Bonora E. Risk of cardiovascular disease. *New Engl J Med*. 2010;363:1341-50.
- 186.** Sookoian S, Pirola CJ. Non-alcoholic fatty liver disease is strongly associated with carotid atherosclerosis: a systematic review. *J Hapatol*. 2008;49(4):600-7.
- 187.** Adams LA, Lymp JF, St Sauver J, Sanderson SO, Lindor KD, Feldstein A, Angulo P. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology*. 2005 1;129:113-21.
- 188.** Ekstedt M, Franz_en LE, Mathiesen UL, Thorelius L, Holmqvist M, Bodemar G, Kechagias S. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology*. 2006;44:865-73.
- 189.** Dunn W, Xu R, Wingard D, Rogers C, Angulo P, Younossi ZM, Schwimmer JB. Suspected Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Mortality Risk in a Population-based Cohort Study. *Am J of Gastroenterology*. 2008;103:2263-71.
- 190.** Rafiq N, Bai CH, Fang Y, Srishord M, McCullough A, Gramlich T, Younossi ZM. Long-Term Follow-Up of Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver. *Clinical Gastro and Hepatology*. 2009;7:234-8.

191. Dam-Larsen S, Becker U, Franzmann MB, Larsen K, Christoffersen P, Bendtsen F. Final results of a long-term, clinical follow-up in fatty liver patients. *Scand J Gastroenterol*. 2009;44(10):1236-43.
192. Stepanova M, Rafiq N, Younossi ZM. Components of metabolic síndrome as independent predictors of mortality in chronic liver disease: A population-based study. *Gut*. 2010;59(10):1410-5.
193. Söderberg C, Stal P, Askling J, Glaumann H, Lindberg G, Marmur J, Hultcrantz R. Decreased survival of subjects with elevated liver function tests during a 28-year follow-up. *Hepatology*. 2010;51:595-602.
194. Arena U, Vizzutti F, Abrandes JG, Corti G, Stasi C, Moscarella S, et al. Reliability of transient elastography for the diagnosis of advanced fibrosis in chronic hepatitis C. *Gut*. 2008;57(9):1288-1293.
195. Hashimoto E, et al. The Characteristics and natural history of Japanese patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res*. 2005;33:72.
196. Hamaguchi M, Kojima T, Takeda N, Harano Y, Fujii K, Nakajima T, et al. Nonalcoholic fatty liver disease is a novel predictor of cardiovascular disease. *World J Gastroenterol*. 2007;13:1579-84.
197. Targher G, Bertolini L, Poli F, Rodella S, Scala L, Tessari R, et al. Nonalcoholic fatty liver disease and risk of future cardiovascular events among type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 2005;54:3541-6.
198. Targher G, Bertolini L, Rodella S, Rodella S, Tessari R, Zenari L, et al. Nonalcoholic fatty liver disease is independently associated with an increased incidence of cardiovascular events in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2007;30:2119-21.
199. Villanova N, Moscatiello S, Ramilli S, Bugianesi E, Magalotti D, Vanni E, et al. Endothelial dysfunction and cardiovascular risk profile in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005;42:473-80.
200. Targher G, Bertolini L, Padovani R, Rodella S, Zoppini G, Zenari L, et al. Relations between carotid artery Wall thickness and liver histology in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Diabetes Care*. 2006;29:1325-30.
201. Assy N, Djibre A, Farah R, Grosovski M, Marmor A. Presence of coronary plaques in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Radiology*. 2010;254:393-400.
202. Targher G, Bertolini L, Rodella S, Lippi G, Franchini M, Zoppini G, et al. NASH predicts plasma inflammatory biomarkers independently of visceral fat in men. *Obesity*. 2008;16:1394-9.
203. Kadayifci A, Tan V, Ursell PC, Merriman RB, Bass NM. Clinical and pathological risk factors for atherosclerosis in cirrhosis: A comparison between NASH-related cirrhosis and cirrhosis due to other etiologies. *J Hepatol*. 2008;49:595-9.
204. Adams L, Angulo P. Treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Postgrad Med J*. 2006;82:315-322.
205. Musso G, Gambino R, Cassader M, Pagano G. A Meta-Analysis of Randomized Trials for the Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology*. 2010;52(1):79-104.
206. Reaven G. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988;37:1595-607.
207. Aleixandre A y Miguel M. Síndrome metabólico. *Endocrinol Nutr*. 2007;54(9):473-8.

- 208.** Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsen B, Lahti K, Nissen M, Taskinen MR, Groop L. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care*. 2001;24:683-9.
- 209.** De Fronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol*. 1979;237:214-223.
- 210.** Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome-a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med*. 2006 May;23(5):469-80.
- 211.** Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, Gordon DJ, Krauss RM, Savage PJ, Smith SC Jr, Spertus JA, Costa F; American Heart Association; National Heart, Lung, and Blood Institute. Diagnosis and management of the metabolic syndrome. An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. Executive Summary. *Circulation*. 2005;112:e285-90.
- 212.** Kaur JA. Comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiol Res Pract*. 2014;2014:943162.
- 213.** Pal S, Ellis V. The chronic effects of whey proteins on blood pressure, vascular function, and inflammatory markers in overweight individuals. *Obesity (Silver Spring)*. 2010;18:1354-1359.
- 214.** Cameron AJ, Magliano DJ, Zimmet PZ, Welborn T, Shaw JE. The metabolic syndrome in Australia: prevalence using four definitions. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007;77:471-478.
- 215.** Gu D, Reynolds K, Wu X et al. Prevalence of the metabolic syndrome and overweight among adults in China. *Lancet*. 2005;365:1398-1405.
- 216.** Jeppesen J, Hansen TW, Rasmussen S et al. Insulin resistance, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular disease: a population-based study. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49:2112-2119.
- 217.** Deepa M, Farooq S, Datta M, Deepa R, Mohan V. Prevalence of metabolic syndrome using WHO, ATP III and IDF definitions in Asian Indians: the Chennai Urban Rural Epidemiology Study (CURES-34). *Diabetes Metab Res Rev*. 2007;23:127-134.
- 218.** Waterhouse DF, McLaughlin AM, Sheehan F, O'Shea D. An examination of the prevalence of IDF- and ATP III-defined metabolic syndrome in an Irish screening population. *Ir J Med Sci*. 2009;178:161-166.
- 219.** Lee WY, Park JS, Noh SY et al. Prevalence of the metabolic syndrome among 40,698 Korean metropolitan subjects. *Diabetes Res Clin Pract*. 2004;65:143-149.
- 220.** Ford ES. Prevalence of the metabolic syndrome defined by the International Diabetes Federation among adults in the U.S. *Diabetes Care*. 2005;28:2745-2749.
- 221.** Ervin RB. Prevalence of metabolic syndrome among adults 20 years of age and over, by sex, age, race and ethnicity, and body mass index: United States, 2003-2006. *Natl Health Stat Report*. 2009;5:1-7.
- 222.** Anderson PJ, Critchley JA. Factor analysis of the metabolic syndrome: obesity vs. insulin resistance as the central abnormality. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2001;25:1782-8.
- 223.** Ogden CL, Carroll MD, Kit BK, Flegal KM. Prevalence of obesity in the United States, 2009-2010. *NCHS Data Brief*. 2012 Jan;(82):1-8.

224. Ravussin E, Swinburn B. Pathophysiology of obesity. *Lancet*. 1992; 340(8816):404-8.
225. Global status report on noncommunicable diseases 2010. WHO library 2011. ISBN978 92 4 068645 8. http://www.who.int/nmh/publications/ncd_report_full_en.pdf.
226. Gutiérrez-Fisac JL, Guallar-Castillón P, León-Muñoz LM, Graciani A, Banegas JR, Rodríguez-Artalejo F. Prevalence of general and abdominal obesity in the adult population of Spain, 2008-2010: the ENRICA study. *Obes Rev*. 2012 Apr;13(4):388-92.
227. Salas-Salvadó J, Rubio MA, Barbany M, Moreno B; Grupo Colaborativo de la SEEDO. [SEEDO 2007 Consensus for the evaluation of overweight and obesity and the establishment of therapeutic intervention criteria]. *Med Clin (Barc)*. 2007 Feb 10;128(5):184-96.
228. Zimmet P, Magliano D, Matsuzawa Y, Alberti G, Shaw J. The metabolic syndrome: a global public health problem and a new definition. *J Atheroscler Thromb*. 2005;12(6):295-300.
229. Sharma AM, Kushner RF. A proposed clinical staging system for obesity. *Int J Obes (Lond)*. 2009 Mar;33(3):289-95.
230. Pedersen BK, Febbraio MA. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol*. 2012 Apr 3;8(8):457-65.
231. Lancha A, Frühbeck G, Gómez-Ambrosi J. Peripheral signalling involved in energy homeostasis control. *Nutr Res Rev*. 2012 Dec;25(2):223-48.
232. Erkelens DW. Insulin resistance syndrome and type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol*. 2001;88:J38-42.
233. Reaven GM. Banting lecture 1988: role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988;37:1595-607.
234. Ueno H. Blood flow regulates the development of vascular hypertrophy, smooth muscle cell proliferation, and endothelial cell oxide synthase in hypertension. *Hypertension*. 2000;36:89-93.
235. Arcaro G, Cretti A. Insulin causes endothelial dysfunction in humans: Sites and mechanisms. *Circulation*. 2002;105:576-82.
236. Liese AD, Hense HW, Döring A. Microalbuminuria, central adiposity and hypertension in the non-diabetic urban population of the MONICA Augsburg Survey 1994/95. *J Human Hypertens*. 2001;5:799-804.
237. Neeland JJ, Turer AT, Ayers CR, Powell-Wiley TM, Vega GL, Farzaneh-Far R, Grundy SM, Khera A, McGuire DK, de Lemos JA. Dysfunctional adiposity and the risk of prediabetes and type 2 diabetes in obese adults. *JAMA*. 2012 Sep 19;308(11):1150-9.
238. Stefan, N., Häring, H. U., Hu, F. B., & Schulze, M. B. Metabolically healthy obesity: epidemiology, mechanisms, and clinical implications. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. 2013;1:152-162.
239. Sowers JR. Insulin resistance and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286:H1597–H1602.

- 240.** Moore LL, Vioni AJ, Qureshi MM, Bradlee ML, Ellison RC, D'Agostino R. Weight loss in overweight adults and the long-term risk of hypertension: the Framingham study. *Arch Intern Med.* 2005 Jun 13;165(11):1298-303.
- 241.** Kurukulasuriya LR, Stas S, Lastra G, Manrique C, Sowers JR. Hypertension in obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2008 Sep;37(3):647-62.
- 242.** Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT Jr, Roccella EJ; National Heart, Lung, and Blood Institute Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA.* 2003 May 21;289(19):2560-72.
- 243.** Sattar N, Williams K, Sniderman A, D'Agostino R, Haffner S. Comparison of the associations of apolipoprotein B and non- high-density lipoprotein cholesterol with other cardiovascular risk factors in patients with the metabolic syndrome in the insulin resistance atherosclerosis study. *Circulation.* 2004;110:2687-93.
- 244.** Ninomiya JK, L'Italien G, Criqui MH, Whyte JL, Gamst A, Chen RS, et al. Association of the metabolic syndrome with history of myocardial infarction and stroke in the third national health and nutrition examination survey. *Circulation.* 2004;109:42-6.
- 245.** Franssen R, Monajemi H, Stroes ES, Kastelein JJ. Obesity and dyslipidemia. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2008 Sep;37(3):623-33.
- 246.** De Koning L, Merchant AT, Pogue J, Anand SS. Waist circumference and waist- to-hip ratio as predictors of cardiovascular events: meta-regression analysis of prospective studies. *Eur Heart J.* 2007 Apr;28(7):850-6.
- 247.** Varady KA, Santosa S, Jones PJ. Validation of hand-held bioelectrical impedance analysis with magnetic resonance imaging for the assessment of body composition in overweight women. *Am J Hum Biol.* 2007;19:429-433.
- 248.** Hainer V, Kunesova M, Parizkova J, Stich V, Horejs J, Muller L. Body fat assessment by a new bipedal bioimpedance instrument in normal weight and obese women. *Sb Lek.* 1995;96:249-256.
- 249.** Bioelectrical impedance analysis in body composition measurement: National Institutes of Health Technology Assessment Conference Statement. *Am J Clin Nutr.* 1996;64:524S-532S.
- 250.** Nuñez C, Gallagher D, Visser M, Pi-Sunyer FX, Wang Z, Heymsfield SB. Bioimpedance analysis: evaluation of leg-to-leg system based on pressure contact footpad electrodes. *Med Sri Sportc Exerr.* 1997;29:524-531.
- 251.** Jebb SA, Cole TJ, Doman D, Murgatroyd PR, Prentice AM. Evaluation of the novel Tanita body-fat analyser to measure body composition by comparison with a four-compartment model. *Br J Nutr.* 2000;83:115-122.
- 252.** Jebb SA, Siervo M, Murgatroyd PR, Evans S, fruhbeck G, Prentice AM. Validity of the leg-to-leg bioimpedance to estimate changes in body fat during weight

loss and regain in overweight women: a comparison with multi-compartment models. *Int J Obec (Lond)*. 2007;31:756-762.

253. Pateyjohns IR, Brinkworth GD, Buckley JD, Noakes M, Clifton PM. Comparison of three bioelectrical impedance methods with DXA in overweight and obese men. *Obecity (Silver Spring)*. 2006;14:2064-2070.

254. De Lorenzo A, Andreoli A. Segmental bioelectrical impedance analysis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2003;6:551-555.

255. Matthie J, Zarowitz B, De Lorenzo A, et al. Analytic assessment of the various bioimpedance methods used to estimate body water. *J Appl Pkyciol*. 1998;84:1801-1816.

256. Kyle UG, Bosaeus I, De Lorenzo AD et al. Bioelectrical impedance analysis—part I: review of principles and methods. *Clin Nutr*. 2004;23:1226-1243.

257. American Diabetes Association. Standards of median care in diabetes 2008. *Diabetes Care*. 2008;31 Suppl 1:S112-54.

258. Reaven GM. Insulin resistance: the link between obesity and cardiovascular disease. *Med Clin North Am*. 2011 Sep;95(5):875-92.

259. OMS Diabetes; Nota descriptiva N°312 Septiembre de 2011. Disponible: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/index.html>.

260. Diabetes Prevention Program Research Group, Knowler WC, Fowler SE, Hamman RF, Christophi CA, Hoffman HJ, Brenneman AT, Brown-Friday JO, Goldberg R, Venditti E, Nathan DM. 10-year follow-up of diabetes incidence and weight loss in the Diabetes Prevention Program Outcomes Study. *Lancet*. 2009 Nov 14;374(9702):1677-86.

261. Santos FL, Esteves SS, da Costa Pereira A, Yancy WS Jr, Nunes JP. Systematic review and meta-analysis of clinical trials of the effects of low carbohydrate diets on cardiovascular risk factors. *Obes Rev*. 2012 Nov;13(11):1048-66.

262. Serra-Majem Ll, Ribas L, García A, Pérez-Rodríguez C, Aranceta J. Nutrient adequacy and Mediterranean diet in Spanish school children and adolescents. *European Eur J Clin Nutr*. 2003; 57 Suppl 1:S35-S39.

263. Trichopoulou A, Costacou T, Barmia C, Trichopoulos D. Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *N Engl J Med*. 2003; 348(26):2599-2608.

264. Martínez- González MA, De la Fuente-Arrillaga C, Nuñez-Córdoba JM, Basterra-Gostari FJ, Vázquez Z, Benito S et al. Adherence to Mediterranean diet and risk developing diabetes: prospective cohort study. *BMJ*. 2008. 336(7657):1348-1351.

265. Trichopoulou A, Barmia C, Trichopoulos D. Mediterranean diet and survival among patients with coronary heart disease in Grece. *Arch Intern Med*. 2005; 165(8):929-935.

266. Martínez-González MA, Corella D, Salas-Salvadó J, Ros E, Covas MI, Fiol M et al. Cohort profile: design and methods of the PREDIMED study. *Int J Epidemiol*. 2012; 41(2):377-385. doi: 10.1093/ije/dyq250.

- 267.** Serra-Majem LI, Ribas L, Ngo J, Ortega RM, Garcia A, PérezRodríguez C et al. Food, youth and the Mediterranean diet in Spain. Development of KidMed, Mediterranean Diet Quality Index in children and adolescent. PHN. 2004;7(7):931-935.
- 268.** Sofi F, Cesari F, Abbate R, Gensini JF, Casini A. Adherence to Mediterranean diet and health status: meta-analysis. BMJ. 2008; 337:a1344, doi:10.1136/bmj.a1344.
- 269.** Sofi F, Abbate R, Franco G, Casini A. Accruing evidence on benefits of adherence to the Mediterranean diet on health: an updated systematic review and meta-analysis. Am J Clin Nutr. 2010;92:1189–1196.
- 270.** Pérez C, Aranceta J. La dieta Mediterránea en el marco de la nutrición comunitaria: luces y sombras. En En Alonso E., VarelaMoreiras G y Silvestre D. coord. ¿Es posible la dieta Mediterránea en el siglo XXI?. Fundación Tomás Pascual y Gómez-Cuétara P. Universidad San Pablo CEU y Universidad Cardenal Herrera CEU. Madrid. 2011.
- 271.** Bach A, Serra-Majem L, Carrasco JL, Roman B, Ngo J, Bertomeu I et al. The use of indexes evaluating the adherence to the Mediterranean diet in epidemiological studies: a review. PHN. 2006;9(1A):132-46.
- 272.** Laaksonen D, Lakka HM, Salonen JT, Niskanen LK, Rauramaa R, Lakka TA. Low levels of leisure-time physical activity and cardiorespiratory fitness predict development of the metabolic syndrome. Diabetes Care. 2002;25:1612-8.
- 273.** Ainsworth BE. How do I measure physical activity in my patients. Questionnaires and objective methods. Br J Sports Med. 2009;43:6-9.
- 274.** Craig CL, Marshall AL, Sjoström M, Bauman AE, Booth ML, Ainsworth BE, et al. International Physical Activity Questionnaire: 12-Country Reliability and Validity. Med Sci Sports Exerc. 2003;35:1381-95.
- 275.** Hagströmer M, Bergman P, de Bordeaudhuij I, Ortega FB, Ruiz JR, Manios Y, et al. Concurrent validity of a modified version of the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ-A) in European Adolescents: The HELENA Study. Int J Obesity (Lond). 2008;32:S42-8.
- 276.** Bäckhed F, Ley R, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. Science. 2005;307:1915-20.
- 277.** Savage DC. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. Annu Rev Microbiol. 1977;31:107-33.
- 278.** Ley RE, Hamady M, Lozupone C, Turnbaugh P, Ramey RR, Bircher JS, et al. Evolution of mammals and their gut microbes. Science. 2008;320:1647-51.
- 279.** Bik EM, Eckburg PB, Gill SR, Nelson KE, Purdom EA, Francois F, et al. Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. Proc Natl Acad Sci USA. 2006;103:732-7.
- 280.** Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. Nature. 2012;489:220-30.
- 281.** Ursell LK, Clemente JC, Rideout JR, Gevers D, Caporaso JG, Knight R. The interpersonal and intrapersonal diversity of human-associated microbiota in key body sites. J Allergy Clin Immunol. 2012;129:1204-8.

282. O'Toole PW, Claesson MJ. Gut microbiota: Changes throughout the lifespan from infancy to elderly. *Int Dairy J.* 2010;20:281-91.
283. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science.* 2011;334:105-8.
284. Dethlefsen L, Huse S, Sogin ML, Relman DA. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biol.* 2008;6:280.
285. Scott KP, Duncan SH, and Flint HJ. Dietary fibre and the gut microbiota. *Nutr. Bull.* 2008;33:201–211.
286. Turnbaugh P, Ridaura V, Faith J, Rey F, Knight R and Gordon J. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci. Transl. Med.* 2009;1:6–14.
287. Turnbaugh P, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature.* 2009;457:480–484.
288. Hildebrandt MA, Hoffmann C, Sherrill-Mix SA, Keilbaugh SA, Hamady M, Chen Y, et al. High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. *Gastroenterology.* 2009;137:1716–1724.
289. Walker A, Ince J, Duncan S, Webster L, Holtrop G, Ze X, et al. Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *ISME J.* 2011;5:220–230.
290. Santacruz A, Marcos A, Warnberg J, Marti A, Martin-Matillas M, Campoy C, et al. Interplay between weight loss and gut microbiota composition in overweight adolescents. *Obesity (Silver Spring).* 2009;17:1906–1915.
291. De Palma G, Nadal I, Collado M, and Sanz Y. Effects of a gluten-free diet on gut microbiota and immune function in healthy adult human subjects. *Br. J. Nutr.* 2009;102:1154–1160.
292. Muegge B, Kuczynski J, Knights D, Clemente JC, González A, Fontana L, et al. Diet drives convergence in gut microbiome functions across mammalian phylogeny and within humans. *Science.* 2011;332:970–974.
293. Zimmer J, Lange B, Frick J, Sauer H, Zimmermann K, Schwiertz A, et al. A vegan or vegetarian diet substantially alters the human colonic faecal microbiota. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2011;66:53–60.
294. Liszt K, Zwielehner J, Handschur M, Hippe B, Thaler R, and Haslberger A. Characterization of bacteria, clostridia and bacteroides in faeces of vegetarians using qPCR and PCR-DGGE fingerprinting. *Ann. Nutr. Metab.* 2009;54:253–257.
295. Sullivan A, Edlund C, and Nord C. Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. *Lancet Infect. Dis.* 2001;1:101–114.
296. Jernberg C, Löfmark S, Edlund C, and Jansson J. Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *ISME J.* 2007;1:56–66.

- 297.** Dethlefsen L, and Relman D. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2011;108:4554–4561.
- 298.** Thuny F, Richet H, Casalta JP, Angelakis E, Habib G, and Raoult D. Vancomycin treatment of infective endocarditis is linked with recently acquired obesity. *PLoS ONE* 2010;5:9074.
- 299.** Ajslev T, Andersen C, Gamborg M, Sorensen T, and Jess T. Childhood overweight after establishment of the gut microbiota: the role of delivery mode, pre-pregnancy weight and early administration of antibiotics. *Int. J. Obes.* 2011;35:522–529.
- 300.** Trehan I, Goldbach H, LaGrone L, Meuli G, Wang R, Maleta K, et al. Antibiotics as part of the management of severe acute malnutrition. *N. Engl. J. Med.* 2013;368:425–435.
- 301.** Bech-Nielsen G, Hansen C, Hufeldt M, Nielsen D, Aasted B, Vogensen F, et al. Manipulation of the gut microbiota in C57BL/6 mice changes glucose tolerance without affecting weight development and gut mucosal immunity. *Res. Vet. Sci.* 2012;92:501-508.
- 302.** Murphy E, Cotter P, Hogan A, O’Sullivan O, Joyce A, Fouhy F, et al. Divergent metabolic outcomes arising from targeted manipulation of the gut microbiota in diet-induced obesity. *Gut.* 2013;62:220–226.
- 303.** Brugman S, Klatter F, Visser J, Wildeboer-Veloo A, Harmsen H, Rozing J, et al. Antibiotic treatment partially protects against type 1 diabetes in the Bio-Breeding diabetes-prone rat. Is the gut flora involved in the development of type 1 diabetes? *Diabetologia.* 2006;49:2105–2108.
- 304.** Hernandez E, Bargiela R, Diez M, Friedrichs A, Perez-Cobas A, Gosalbes M, et al. Functional consequences of microbial shifts in the human gastrointestinal tract linked to antibiotic treatment and obesity. *Gut Microbes.* 2013;4:306–315.
- 305.** Zoetendal EG, Akkermans ADL, Akkermans-van Vliet WM, de Visser JAGM, de Vos WM. The host genotype affects the bacteria community in the human gastrointestinal tract. *Microb Ecol Health Dis.* 2001;13:129-134.
- 306.** Toivanen P, Vaahtovuori J, Eerola E. Influence of major histocompatibility complex in bacterial composition of fecal flora. *Infect Immun.* 2001;69:2372-2377.
- 307.** Fanaro S, Chierici R, Guerrini P, Vigi V. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr Suppl.* 2003;91:48-55.
- 308.** Ross JM, Needham JR. Genital flora during pregnancy and colonization of the newborn. *J R Soc Med* 1980;73:105-110.
- 309.** Rotimi VO, Duerden BI. The development of bacterial flora in normal neonates. *J Med Microbiol.* 1981;14:51-62.
- 310.** Grönlund MM, Lehtonen OP, Eerola E, Kero P. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after caesarean delivery. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1999; 28:19-25.
- 311.** Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Raangs GC, Wagendorp AA, Klijn N, Bindels JG, Welling GW. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and

formula fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2000;30:61-67.

312. Kleessen B, Bunke H, Tovar K, Noak J, Sawatzki G. Influence of two infants formulas and human milk on the development of the faecal flora in newborn infants. *Acta Pediatr.* 1995;84:1347-1356.

313. Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr.* 1999;69:1035S-1045S.

314. Favier CF, Vaughan EE, de Vos WM, Akkermans ADL. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68:219-226.

315. Martín R, Langa S, Reviriego C, Jiménez E, Marín ML, Olivares M, Bouza J, Fernández L, Xaus J, Rodríguez JM. The commensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. *Trends Food Sci Tech.* 2004;15:121-127.

316. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner ACR, Yu WH, et al. The human oral microbiome. *J Bacteriol.* 2010;192:5002-17.

317. Macy JM, Yu I, Caldwell C, Hungate RE. Reliable sampling methods for analysis of the ecology of the human alimentary tract. *Appl Environ Microbiol.* 1978;35:113-120.

318. Peek RM, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer.* 2002;2:28-37.

319. Simon GL, Gorbach SL. Intestinal microflora. *Med Clin North Am* 1982;66:557-74.

320. Croucher SC, Houston AP, Bayliss CE, Turner RJ. Bacterial populations associated with different regions of the human colon wall. *Appl Environ Microbiol* 1983;45:1025-1033.

321. Nord CE, Kager L. The normal flora of the gastrointestinal tract. *Neth J Med* 1984;27:249-252.

322. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science.* 2005;308:1635-8.

323. Stephen AM, Cummings JH. The microbial contribution to human faecal mass. *J Med Microbiol* 1980;13:45-56.

324. Conway PL. Microbial ecology of the human large intestine. En: Gibson GR, Macfarlane GT (eds). *Human Colonic Bacteria: Role in Nutrition Physiology and Pathology.* CRC Press, Florida. 1995:1-24.

325. Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis in't Veld JH. Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol.* 1998;41:85-101.

326. Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault MC, Cummings JH, Franck A, Gibson GR, Isolauri E, Moreau MC, Roberfroid M, Rowland I. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr.* 1998;80(Suppl 1):S147-S171.

327. Hollister EB, Gao C, Versalovic J. Compositional and functional features of the gastrointestinal microbiome and their effects on human health. *Gastroenterology.* 2014;146:1449-58.

- 328.** Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006;444:1022-3.
- 329.** Pflughoeft KJ, Versalovic J. Human microbiome in health and disease. *Annu Rev Pathol*. 2012;7:99-122.
- 330.** Arumugam M, Raes J, Pelletier E, le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011;473:174-80.
- 331.** Bäckhed F, Fraser CM, Ringel Y, Sanders ME, Sartor RB, Sherman PM, et al. Defining a healthy human gut microbiome: Current concepts, future directions, and clinical applications. *Cell Host Microbe*. 2012;12:611-22.
- 332.** Yang X, Xie L, Li Y, Wei C. More than 9,000,000 unique genes in human gut bacterial community: Estimating gene numbers inside a human body. *PLoS One*. 2009;4:6074.
- 333.** Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science*. 2001;291:881-884.
- 334.** Gibson GR, Moeller I, Kagelari O, Folino M, Young GP. Contrasting effects of butyrate on the expression of phenotypic markers of differentiation in neoplastic and non-neoplastic colonic epithelial cells in vitro. *J Gastroenterol Hepatol*. 1992;7:165-172.
- 335.** Scheppach W, Bartram HP, Richter F. Role of short-chain fatty acids in the prevention of colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 1995;31A:1077-1080.
- 336.** Rowland IR. Toxicology of the colon. Role of the intestinal microflora. En: Gibson G, Macfarlane GT (eds). *Human Colonic Bacteria: Role in Nutrition, Physiology and Pathology*. CRC Press Boca Raton, Florida. 1995:155-174.
- 337.** Parodi PW. The role of intestinal bacteria in the causation and prevention of cancer: modulation by diet and probiotics. *Aust J Dairy Technol*. 1999;54:103-121.
- 338.** Macfarlane GT, Macfarlane S. Human colonic microbiota: ecology, physiology and metabolic potential of intestinal bacteria. *Scan J Gastroenterol*. 1997;S222:3-9.
- 339.** Hill MJ. Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. *Eur J Cancer Prev*. 1997;6:S43-S45.
- 340.** Miyazawa E, Iwabuchi A, Yoshida T. Phytate breakdown and apparent absorption of phosphorous, calcium and magnesium in germfree and conventional rats. *Nutr Res*. 1996;16:603-613.
- 341.** Macfarlane GT, Gibson GR, Cummings JH. Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon. *J Appl Bacteriol*. 1992;72:57-64.
- 342.** Bauer E, Williams BA, Smidt H, Verstegen MW, Mosenthin R. Influence of the gastrointestinal microbiota on development of the immune system in young animals. *Curr Issues Intest Microbiol* 2006;7(2):35-51.
- 343.** Brandtzaeg P. Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions. *Scand J Immunol*. 2009;70:505-15.
- 344.** Yamanaka T, Helgeland L, Farstad IN, Fukushima H, Midtvedt T, Brandtzaeg P. Microbial colonization drives lymphocyte accumulation and

differentiation in the follicle associated epithelium of Peyer's patches. *J Immunol.* 2003;170:816-22.

345. Garrett WS, Gordon JI, Glimcher LH. Homeostasis and inflammation in the intestine. *Cell.* 2010;140:859-70.

346. Zak DE, Aderem A. Systems biology of innate immunity. *Immunol Rev.* 2009;227:264-82.

347. Guarner F, Bourdet-Sicard R, Brandtzaeg P, Gill HS, McGuirk P, van Eden W, et al. Mechanisms of Disease: the hygiene hypothesis revisited. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2006;3:275-84.

348. Björkstén B. Disease outcomes as a consequence of environmental influences on the development of the immune system. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2009;9:185-9.

349. Sanders JW, Tribble DR. Diarrhoea in the returned traveller. *Curr Gastroenterol Rep.* 2001;3:304-314.

350. Ciarlet M, Estes MK. Interactions between rotavirus and gastrointestinal cells. *Curr Opin Microbiol.* 2001;4:435-41.

351. Bergogne-Bérézin E. Treatment and prevention of antibiotic associated diarrhoea. *Int J Antimicrob Agents.* 2000;16:521-526.

352. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Hungin AP, Jones R, Axon A, Graham DY, Tytgat G. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht 2-2000 Consensus Report. *Aliment Pharmacol Ther.* 2002;16:167-80.

353. Hopkin JM. Mechanisms of enhanced prevalence of asthma and atopy in developed countries. *Curr Opin Immunol.* 1997;9:788-792.

354. Camilleri M. Management of the irritable bowel syndrome. *Gastroenterology.* 2001;120:652-668.

355. Thornley JP, Jenkins D, Neal K, Wright T, Brough J, Spiller RC. Relationship of *Campylobacter* toxigenicity in vitro to the development of postinfectious irritable bowel syndrome. *J Infect Dis.* 2001;184:606-609.

356. Nobaek S, Johansson ML, Molin G, Ahrné S, Jeppsson B. Alteration of intestinal microflora is associated with reduction in abdominal bloating and pain in patients with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol.* 2000;95:1231-1238.

357. Pimentel M, Chow EJ, Lin HC. Eradication of small intestinal bacteria overgrowth reduces symptoms of irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol.* 2000;95:3503-3506.

358. Horwitz BJ, Fisher RS. The irritable bowel syndrome. *N Engl J Med.* 2001;344:1846-1850.

359. Hata K, Andoh A, Sato H, Araki Y, Tanaka M, Tsujikawa T, Fujiyama Y, Bamba T. Sequential changes in luminal microflora and mucosal cytokine expression during developing of colitis in HLA-B27/beta2-microglobulin transgenic rats. *Scand J Gastroenterol.* 2001;36:1185-1192.

360. Saitoh S, Noda S, Aiba Y, Takagi A, Sakamoto M, Benno Y, Koga Y. *Bacteroides ovatus* as the predominant commensal intestinal microbe causing a

systemic antibody response in inflammatory bowel disease. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002;9:54-9.

361. Holgate ST. The epidemic of allergy and asthma. *Nature.* 1999;402:B2-B4.

362. Kirjavainen PV, Gibson GR. Healthy gut microflora and allergy: factors influencing development of the microbiota. *Ann Med.* 1999;31:288-292.

363. Kalliomäki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 2001;357:1076-1079.

364. Greenwald P, Clifford CK, Milner JA. Diet and cancer prevention. *Eur J Cancer.* 2001;37:948-965.

365. Kim DH, Jin YH Intestinal bacteria beta-glucuronidase activity of patients with colon cancer. *Arch Pharm Res.* 2001;24:564-567.

366. Mortensen PB, Clausen MR. Short-chain fatty acids in the human colon: relation to gastrointestinal health and disease. *Scan J Gastroenterol Suppl.* 1996;216:132-148.

367. Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, and Gordon JI Obesity alters gut microbial ecology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005;102:11070–11075.

368. Ley RE. Obesity and the human microbiome. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2010;26:5–11.

369. Armougom F, Henry M, Vialettes B, Raccach D, and Raoult D. Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in *Lactobacillus* in obese patients and methanogens in anorexic patients. *PLoS ONE.* 2009;4:e7125.

370. Furet JP, Kong LC, Tap J, Poitou C, Basdevant A, Bouillot JL, et al. Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: links with metabolic and low-grade inflammation markers. *Diabetes.* 2010;59:3049–3057.

371. Collado M, Isolauri E, Laitinen K, and Salminen S. Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women. *Am. J. Clin. Nutr.* 2008;88:894-9.

372. Million M, Maraninchi M, Henry M, Armougom F, and Raoult D. Obesity-associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*. *Int. J. Obes.* 2012;36:817–825.

373. Duncan S, Lopley G, Holtrop G, Ince J, Johnstone A, Louis P, et al. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *Int. J. Obes.* 2008;32:1720–1724.

374. Mai V, McCrary Q, Sinha R, and Gleib M. Associations between dietary habits and body mass index with gut microbiota composition and fecal water genotoxicity: an observational study in African American and Caucasian American volunteers. *Nutr. J.* 2009;8:49.

- 375.** Jumpertz R, Le D, Turnbaugh P, Trinidad C, Bogardus C, Gordon JI, et al. Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 2011;94:58–65.
- 376.** Erejuwa O, Sulaiman, SA, and Wahab M. Modulation of gut microbiota in the management of metabolic disorders: the prospects and challenges. *Int. J. Mol. Sci.* 2014;15:4158–4188.
- 377.** Bäckhed F, Manchester JK, Semenkovich C, and Gordon J. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007;104:979–984.
- 378.** Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, and Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature.* 2006;444:1027–1031.
- 379.** Zhang H, DiBaise J, Zuccolo A, Kudrna D, Braidotti M, Yu Y, et al. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009;106:2365–2370.
- 380.** Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper L, Koh G, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004;101:15718–15723.
- 381.** Turnbaugh P, Bäckhed F, Fulton L, and Gordon J. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe.* 2008;3:213–223.
- 382.** Kalliomäki M, Collado M, Salminen S, and Isolauri E. Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. *Am. J. Clin. Nutr.* 2008;87:534–538.
- 383.** Drissi F, Merhej V, Angelakis E, El Kaoutari A, Carrière F, Henrissat B, et al. Comparative genomics analysis of *Lactobacillus* species associated with weight gain or weight protection. *Nutr. Diabetes.* 2014;4:109.
- 384.** Pickup J, and Crook M. Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia.* 1998;41:1241–1248.
- 385.** Hotamisligil G. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 2006;444:860–867.
- 386.** Shoelson S, Lee J, and Goldfine A. Inflammation and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 2006;116:1793–1801.
- 387.** Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature.* 2012;490:55–60.
- 388.** Karlsson F, Tremaroli V, Nookaew I, Bergström G, Behre C, Fagerberg B, et al. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature.* 2013;498:99–103.
- 389.** Serino M, Fernández-Real JM, Fuentes EG, Queipo-Ortuño M, Moreno-Navarrete JM, Sánchez A, et al. The gut microbiota profile is associated with insulin action in humans. *Acta Diabetol.* 2013;50:753–761.

- 390.** Murri M, Leiva I, Gomez-Zumaquero JM, Tinahones FJ, Cardona F, Soriguer F, et al. Gut microbiota in children with type 1 diabetes differs from that in healthy children: a case-control study. *BMC Med.* 2013;11:46.
- 391.** Larsen N, Vogensen FK, Van den Berg F, Nielsen D, Andreasen A, Pedersen B, et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS ONE.* 2010;5:9085.
- 392.** Caricilli, A, and Saad M. The role of gut microbiota on insulin resistance. *Nutrients.* 2013;5:829–851.
- 393.** Stachowicz N, and Kiersztan A. The role of gut microbiota in the pathogenesis of obesity and diabetes. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 2013;67:288–303.
- 394.** Tagliabue A, and Elli M. The role of gut microbiota in human obesity: recent findings and future perspectives. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2013;23:160–168.
- 395.** Amar J, Chabo C, Waget A, Klopp P, Vachoux C, Bermudez-Humaran L, et al. Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment. *EMBO Mol. Med.* 2011;3:559–572.
- 396.** Cani P, Neyrinck A, Fava F, Knauf C, Burcelin R, Tuohy K, et al. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia.* 2007;50:2374–2383.
- 397.** Manco M, Putignani L, and Bottazzo G. Gut microbiota, lipopolysaccharides, and innate immunity in the pathogenesis of obesity and cardiovascular risk. *Endocr. Rev.* 2010;31:817–844.
- 398.** Amar J, Burcelin R, Ruidavets J, Cani P, Fauvel J, Alessi M, et al. Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *Am. J. Clin. Nutr.* 2008;87:1219–1223.
- 399.** Cani P, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck A, Delzenne N, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes.* 2008;57:1470–1481.
- 400.** Cani P, Possemiers S, Van de Wiele T, Guiot Y, Everard A, Rottier O, et al. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut.* 2009;58:1091–1103.
- 401.** Cani P, Amar J, Iglesias M, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes.* 2007;56:1761–1772.
- 402.** Clemente M, Queipo MI, Murri M, Boto M, Pérez P, Andres Lacueva C, et al. Endotoxin increase after fat over-load is related to postprandial hypertriglyceridemia in morbidly obese patients. *J. Lipid Res.* 2012;53:973–978.
- 403.** Rodes L, Khan A, Paul A, Coussa-Charley M, Marinescu D, Tomaro-Duchesneau C, et al. Effect of probiotics *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* on gut-derived lipopolysaccharides and inflammatory cytokines: an in vitro study using a human colonic microbiota model. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2013;23:518–526.

- 404.** Leber B, Spindelboeck W, Stadlbauer V. Infectious complications of acute and chronic liver disease. *Semin Respir Crit Care Med.* 2012;33:80–95.
- 405.** Lu H, Wu Z, Xu W, et al. Intestinal microbiota was assessed in cirrhotic patients with hepatitis B virus infection. *Intestinal microbiota of HBV cirrhotic patients.* *Microb Ecol.* 2011;61:693–703.
- 406.** Chen Y, Yang F, Lu H, et al. Characterization of fecal microbial communities in patients with liver cirrhosis. *Hepatology.* 2011;54:562–572.
- 407.** Mutlu EA, Gillevet PM, Rangwala H, et al. Colonic microbiome is altered in alcoholism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2012;302:G966–G978.
- 408.** Fouts DE, Torralba M, Nelson KE, et al. Bacterial translocation and changes in the intestinal microbiome in mouse models of liver disease. *J Hepatol.* 2012;56:1283–1292.
- 409.** Hartmann P, Chen WC, Schnabl B. The intestinal microbiome and the leaky gut as therapeutic targets in alcoholic liver disease. *Front Physiol.* 2012;3:402.
- 410.** Choi Y, Jeon WK, Hwang SJ, et al. The role of the gut barrier function in the pathophysiology of viral liver cirrhosis. *Hepatogastroenterology.* 2011;58:1244–1247.
- 411.** Assimakopoulos SF, Tsamandas AC, Tsiaoussis GI, et al. Altered intestinal tight junctions' expression in patients with liver cirrhosis: a pathogenetic mechanism of intestinal hyperpermeability. *Eur J Clin Invest.* 2012;42:439–446.
- 412.** Sandler NG, Koh C, Roque A, et al. Host response to translocated microbial products predicts outcomes of patients with HBV or HCV infection. *Gastroenterology.* 2011;141:1220–1230.
- 413.** Vance DE. Role of phosphatidylcholine biosynthesis in the regulation of lipoprotein homeostasis. *Curr Opin Lipidol* 2008;19:229–234.
- 414.** Zeisel SH, Wishnok JS, Blusztajn JK. Formation of methylamines from ingested choline and lecithin. *J Pharmacol Exp Ther* 1983;225:320–324.
- 415.** Zhu L, Baker SS, Gill C, et al. Characterization of the gut microbiome in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: a connection between endogenous alcohol and NASH. *Hepatology.* 2013;57:601–609.
- 416.** O'Sullivan DJ. Methods for analysis of the intestinal microflora. *Curr Issues Intest Microbiol.* 2000;1:39–50.
- 417.** Vaughan EE, Schut F, Heiling HGJ, Zoetendal EG, de Vos WM, Akkermans ADL. A molecular view of the intestinal ecosystem. *Curr Issues Intest Microbiol.* 2000;1:1–12.
- 418.** Zoetendal EG, Collier CT, Koike S, Mackie RI, Gaskins HR. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *J Nur.* 2004;134:465–472.
- 419.** Woese CR, Stackebrandt E, Macke TJ, Fox GE. A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. *Syst Appl Microbiol.* 1985;6:143–51.
- 420.** Woese CR. Bacterial evolution. *Microbiol Rev.* 1987;51(2):221–71.
- 421.** Cuchacovich R. Clinical applications of the polymerase chain reaction: an update. *Infect Dis Clin North Am.* 2006;20(4):735–58.

- 422.** Bartlett JM, Stirling D. A short history of the polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol.* 2003;226:3-6.
- 423.** Cockerill FR 3rd. Application of rapid-cycle real-time polymerase chain reaction for diagnostic testing in the clinical microbiology laboratory. *Arch Pathol Lab Med.* 2003;127(9):1112-20.
- 424.** Bankowski MJ, Anderson SM. Real-time nucleic acid amplification in clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Newsl.* 2004;26:9-15.
- 425.** Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JD, Wengenack NL, Rosenblatt JE, Cockerill FR 3rd, Smith TF. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(1):165-256.
- 426.** VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM. Twenty- five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques.* 2008;44(5):619-26.
- 427.** Maccaferri S, Biagi E, Brigidi P. Metagenomics: key to human gut microbiota. *Dig Dis.* 2011;29(6):525-30.
- 428.** Wang T, Cai G, Qiu Y, Fei N, Zhang M, Pang X, Jia W, Cai S, Zhao L. Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. *ISME J.* 2012;6(2):320-9.
- 429.** Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zhe ng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Doré J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J; MetaHIT Consortium, Bork P, Ehrlich SD, Wang J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature.* 2010;464(7285):59-65.
- 430.** Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota; introducing the concept of prebiotic. *J Nutr.* 1995;125:1401-1412.
- 431.** Schrezenmeir J, de Vrese M. Probiotics, prebiotics and synbiotics; approaching a definition. *Am J Clin Nutr.* 2001;73(2 Suppl):361S-364S.
- 432.** Brandt LJ, Aroniadis OC. An overview of fecal microbiota transplantation: Techniques, indications, and outcomes. *Gastrointest Endosc.* 2013;78:240-9.
- 433.** Hamilton MJ, Weingarden AR, Sadowsky MJ, Khoruts A. Standardized frozen preparation for transplantation of fecal microbiota for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Am J Gastroenterol.* 2012;107:761-7.
- 434.** Sha S, Liang J, Chen M, Xu B, Liang C, Wu K. Systematic review: Faecal microbiota transplantation therapy for digestive and nondigestive disorders in adults and children. *Aliment Pharmacol Ther.* 2014;39:1003-32.
- 435.** Guo X, Xia X, Tang R, Zhou J, Zhao H, Wang K: Development of a real-time PCR method for Firmicutes and Bacteroidetes in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs. *Lett Appl Microbiol.* 2008;47(5):367-373.

- 436.** Stach JE, Maldonado LA, Ward AC, Goodfellow M, Bull AT: New primers for the class Actinobacteria: application to marine and terrestrial environments. *Environ Microbiol.* 2003;5:828-841.
- 437.** Friswell MK, Gika H, Stratford IJ, Theodoridis G, Telfer B, Wilson ID, McBain AJ: Site and strain-specific variation in gut microbiota profiles and metabolism in experimental mice. *PLoS One.* 2010;5:8584.

8. Anexo

8.1. ANEXO I

CONSENTIMIENTO INFORMADO. PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

“ESTUDIO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN PACIENTES CON SÍNDROME METABÓLICO Y ENFERMEDAD HEPÁTICA GRASA NO ALCOHÓLICA”

Tanto el síndrome metabólico (hipertensión, obesidad, hipercolesterolemia o hipertrigliceridemia y diabetes) como el hígado graso son entidades habituales en la actualidad y su aparición o evolución pueden asociarse al tipo de microbiota (conjunto de bacterias que viven en el intestino) existente.

Se solicita su participación en el proyecto destinado a investigar la influencia de la microbiota intestinal en el síndrome metabólico y/o el hígado graso.

El objetivo es examinar rasgos de síndrome metabólico y de hígado graso e identificar diferencias en el tipo de microbiota si las hubiese.

El método de investigación llevado a cabo será seleccionar desde consultas pacientes con obesidad, diabetes, hipertrigliceridemia, hipertensión o hígado graso.

Tras contacto telefónico, los pacientes que acepten participar acudirán en 2 ocasiones al hospital:

- En la primera visita (en consulta externa) acudirán en ayunas, contestarán a 2 encuestas, una sobre la adherencia a la dieta mediterránea y otra sobre los hábitos de ejercicio físico. Asimismo, se llevará a cabo una exploración física de rutina con peso, talla e impedanciometría.

En esta misma visita se realizará un control analítico, indicado por su patología de base, que será de utilidad para el cálculo de un nuevo test (Owl-Liver Test) que permite diferenciar si se padece hígado graso o hígado graso asociado a inflamación.

A cada paciente se le entregará un envase estéril para que posteriormente puedan aportar una muestra de heces.

- En la segunda visita (al laboratorio) los participantes deberán aportar una muestra de heces. Podrán acudir en horario laboral de lunes a viernes sin cita previa.

Durante el proyecto de investigación no se le administrará ningún tratamiento médico adicional, por lo que no se esperan acontecimientos adversos durante el mismo.

Basándonos en los resultados de este estudio, podremos definir con mayor exactitud sus rasgos de síndrome metabólico y determinar sus factores de riesgo cardiovascular (riesgo de infarto, trombosis...). Aunque sin beneficio inmediato para usted, futuros estudios en base a éste probablemente ayudarán a conocer tratamientos como antibióticos o probióticos que podrían ser de utilidad para prevenir o frenar la evolución del síndrome metabólico-hígado graso.

Su participación en este proyecto de investigación es totalmente voluntaria. Puede negarse a participar o retirar su consentimiento en cualquier momento después de firmarlo.

El equipo investigador está formado por Francisca Martín Ocaña (Médico Especialista de Aparato Digestivo e investigadora responsable) y José Manuel García Almeida (Médico Especialista en Endocrinología y Nutrición). Puede contactar con cualquier miembro del equipo investigador si le surge cualquier duda sobre su participación en este proyecto. Para ello podrán dirigirse a la unidad de aparato digestivo del Hospital de la Axarquía en horario de mañana.

Sólo los miembros del equipo investigador tendrán acceso a sus datos personales. Tanto la información que se obtenga al analizar las muestras biológicas como toda la información clínica y sociodemográfica referente a usted será considerada confidencial. Los datos que puedan identificar a los pacientes, se mantendrán de forma separada, y estarán identificados por un código sin relación con su historia clínica o documento de seguridad social. Es posible que los resultados de las investigaciones sean publicados en la literatura científica, pero siempre en forma de resultados globales de todos los participantes. Los datos personales no aparecerán en ningún caso.

El proyecto se realizará siguiendo las Guías de Buenas Prácticas Clínicas y la Declaración de Helsinki (Fortaleza, Brasil 2013).

Se garantiza la confidencialidad de los datos según la Ley Orgánica de Protección de datos de Carácter Personal 15/1999.

Toda la información será utilizada únicamente para los fines reseñados.

Todos los investigadores implicados en el proyecto se comprometen a cumplir las normas necesarias para preservar la confidencialidad de la información facilitada por los participantes.

El presente proyecto se presenta al CEI Provincial de Málaga.

Consentimiento informado
“ESTUDIO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN PACIENTES CON
SÍNDROME METABÓLICO Y ENFERMEDAD HEPÁTICA GRASA NO
ALCOHÓLICA”

Yo,.....

.....,

He leído la hoja de información que se me ha entregado,
he podido hacer preguntas sobre el estudio,
he recibido suficiente información sobre el estudio,
he hablado con: Francisca Martín Ocaña
comprendo que mi participación es voluntaria,
comprendo que puedo retirarme del estudio:

1. Cuando quiera.
 2. Sin tener que dar explicaciones.
 3. Sin que esto repercuta en mis cuidados o atención sanitaria.
- Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

En Málaga ade de 20

Fdo.:

Participante

Fdo.:

Investigador responsable

Consentimiento del representante

Yo, _____ (nombre, _____ apellidos _____ y
DNI).....
en calidad de (relación con el paciente y nombre del
paciente).....

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

Título del estudio:

**“ESTUDIO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN PACIENTES CON
SÍNDROME METABÓLICO Y ENFERMEDAD HEPÁTICA GRASA NO
ALCOHÓLICA”**

He leído la hoja de información que se me ha entregado
he podido hacer preguntas sobre el estudio,
he recibido suficiente información sobre el estudio,
he hablado con: Francisca Martín Ocaña
comprendo que su participación es voluntaria,
comprendo que puede retirarse del estudio:

4. Cuando quiera.
5. Sin tener que dar explicaciones.
6. Sin que esto repercuta en mis cuidados o atención sanitaria.

En mi presencia se le ha facilitado
a..... (NOMBRE DEL PARTICIPANTE) toda la información
pertinente adaptada a su nivel de entendimiento y está de acuerdo en
participar.

En Málaga a de de 20

Fdo.:
Representante

Fdo.:
Investigador responsable

8.2. ANEXO II

CUESTIONARIO DE ADHERENCIA A LA DIETA MEDITERRÁNEA

Pregunta	Modo de Valoración	Puntos
1. ¿Usa el aceite de oliva como principal grasa para cocinar?	<i>Sí = 1 punto</i>	
2. ¿Cuanto aceite de oliva consume en total al día (incluyendo el usado para freír, comidas fuera de casa, ensaladas, etc...)?	<i>2 ó mas cucharadas = 1 punto</i>	
3. ¿Cuántas raciones de verduras u hortalizas consume al día (1 ración = 200 g. Las guarniciones o acompañamientos = ½ ración)?	<i>2 ó más (al menos 1 de ellas en ensalada o</i>	
4. ¿Cuántas piezas de fruta (incluyendo zumo natural) consume al día?	<i>3 ó más = 1 punto</i>	
5. ¿Cuántas raciones de carnes rojas, hamburguesas, salchichas o embutidos consume al día (1 ración = 100-150 g)?	<i>Menos de 1 = 1 punto</i>	
6. ¿Cuántas raciones de mantequilla, margarina o nata consume al día (porción individual = 12 g)?	<i>Menos de 1 = 1</i>	
7. ¿Cuántas bebidas carbonatadas y/o azucaradas (refrescos, colas, tónicas, bitter) consume al día?	<i>Menos de 1 = 1</i>	
8. ¿Bebe vino? ¿Cuanto consume a la semana?	<i>3 ó más vasos = 1</i>	
9. ¿Cuántas raciones de legumbres consume a la semana (1 plato o ración = 150 g)?	<i>3 ó más = 1 punto</i>	
10. ¿Cuántas raciones de pescado/mariscos consume a la semana (1 plato, pieza o ración = 100-150 g de pescado ó 4-5 piezas ó 200 g de marisco)?	<i>3 ó más = 1 punto</i>	
11. ¿Cuántas veces consume repostería comercial (no casera, como: galletas, flanes, dulces, bollería, pasteles) a la semana?	<i>Menos de 3 = 1 punto</i>	
12. ¿Cuántas veces consume frutos secos a la semana (1 ración = 30 g)?	<i>1 ó más = 1 punto</i>	
13. ¿Consume preferentemente carne de pollo, pavo o conejo en vez de ternera, cerdo, hamburguesas o salchichas (carne de pollo, pavo o conejo: 1 pieza o ración de 100-150 g)?	<i>Sí = 1 punto</i>	
14. ¿Cuántas veces a la semana consume los vegetales cocinados, la pasta, arroz u otros platos aderezados con salsa de tomate, ajo, cebolla o puerro elaborada a fuego lento con aceite de oliva (sofrito)?	<i>2 ó más = 1 punto</i>	
Puntuación total		

FUENTE:

Modificado de: Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C, Trichopoulos D. Adherence to a mediterranean diet and survival in a greek population. *N Engl J Med* 2003; 348: 2.599-2.608

8.3. ANEXO III

IPAQ CORTO ÚLTIMOS 7 DÍAS

LEA: Ahora le voy a preguntar acerca del tiempo que Usted fue físicamente activo(a) en los últimos 7 días. Por favor responda cada pregunta aún si Usted no se considera una persona activa. Piense acerca de las actividades que Usted hace en su trabajo, como parte del trabajo en el jardín y en la casa, para ir de un sitio a otro, y en su tiempo libre de descanso, ejercicio o deporte.

LEA: Ahora, piense acerca de todas las actividades vigorosas que requieren un esfuerzo físico fuerte que Usted hizo en los últimos 7 días. Actividades vigorosas son las que hacen respirar mucho más fuerte que lo normal y pueden incluir el levantamiento de objetos pesados, excavar, aeróbicos, o pedalear rápido en bicicleta. Piense solamente en esas actividades que Usted hizo por lo menos 10 minutos continuos.

1. Durante los últimos 7 días ¿Cuántos días hizo Usted actividades físicas vigorosas?

Días por semana [VDAY; Rango: 0-7, 8,9]

8. No sabe /no está seguro(a)

9. Rehusa contestar

[Clarificación por parte del entrevistador: Piense solamente en esas actividades físicas que usted hace por lo menos 10 minutos continuos]

[Nota para el entrevistador: Si la persona entrevistada responde cero, rehusa o no sabe, pase a la pregunta 3]

2. ¿Cuánto tiempo en total usualmente le toma realizar actividades físicas vigorosas en los días que las realiza?

Horas por día [VDHRS; Rango: 0-16]

Minutos por día [VDMIN; Rango: 0-960, 998, 999]

998. No sabe /no está seguro(a) 999. Rehusa contestar

[Clarificación por parte del entrevistador: Piense solamente en esas actividades físicas que usted hace por lo menos 10 minutos continuos]

[Nota para el entrevistador: Se está buscando un tiempo promedio por día. Si la persona entrevistada no puede contestar porque la cantidad de tiempo varia día a día, pregunte: “¿Cuánto tiempo en total le dedicó usted en los últimos 7 días a actividades físicas vigorosas?”]

Horas por semana [VWHRS; Rango: 0-112]

Minutos por semana [VWMIN; Rango: 0-6720, 9998, 9999]

9998. No sabe /no está seguro(a)

9999. Rehusa contestar

LEA: Ahora piense en actividades que requieren esfuerzo físico moderado y que Usted hizo en los últimos 7 días. Actividades físicas moderadas son las que hacen respirar algo más fuerte que lo normal e incluyen cargar cosas ligeras, montar en bicicleta a paso regular, o juego de dobles en tenis. No incluya caminar. Otra vez piense únicamente en aquellas actividades físicas que Usted hizo por lo menos 10 minutos continuos.

3. Durante los últimos 7 días, cuántos días hizo Usted actividades físicas moderadas?

Días por semana [MDAY; Rango: 0-7, 8, 9]

8. No sabe /no está seguro(a)

9. Rehusa contestar

[Clarificación por parte del entrevistador: Piense solamente en esas actividades físicas que usted hace por lo menos 10 minutos continuos]

[Nota para el entrevistador: Si la persona entrevistada responde cero, rehusa o no sabe, pase a la pregunta 5]

4. ¿Cuánto tiempo en total usualmente le dedicó en uno de esos días que hizo actividades físicas moderadas?

Horas por día [MDHRS; Rango: 0-16]

Minutos por día [MDMIN; Rango: 0-960, 998, 999]

998. No sabe /no está seguro(a) 999. Rehusa contestar

[Clarificación por parte del entrevistador: Piense solamente en esas actividades físicas que usted hace por lo menos 10 minutos continuos]

[Nota para el entrevistador: Se necesita un promedio de tiempo al día de uno de los días en los cuales Usted hizo actividad física moderada. Si la persona entrevistada no puede contestar porque la cantidad de tiempo varia día a día, o incluye tiempo dedicado en diferentes trabajos, pregunte:

¿Cuánto tiempo en total le dedicó Usted en los últimos 7 días a hacer actividades físicas moderadas?"

Horas por semana [MWHRS; Rango: 0-112]

Minutos por semana [MWMIN; Rango: 0-6720, 9998, 9999]

9998. No sabe /no está seguro(a)

9999. Rehusa contestar`

LEA: Ahora piense en el tiempo que Usted le dedicó a caminar en los últimos 7 días. Esto incluye caminar en el trabajo y en la casa, caminar para ir de un sitio a otro, y cualquier otra caminata que Usted haya hecho meramente por recreación, deporte, ejercicio o placer.

5. ¿Durante los últimos 7 días, cuántos días caminó Usted por lo menos 10 minutos seguidos?

Días por semana [WDAY; Rango: 0-7, 8, 9]

8. No sabe /no está seguro(a)

9. Rehusa contestar

[Clarificación por parte del entrevistador: Piense solamente acerca de la caminata que Usted da por lo menos por 10 minutos seguidos.]

[Nota para el entrevistador: Si la persona entrevistada responde cero, rehusa o no sabe, pase a la pregunta 7]

6. ¿Cuánto tiempo en total pasó generalmente caminando en uno de esos días?

Horas por día [WDHRS; Rango: 0-16]

Minutos por día [WDMIN; Rango: 0-960, 998, 999]

998. No sabe /no está seguro(a) 999. Rehusa contestar

[Nota para el entrevistador: Se necesita un promedio de tiempo de los días en los cuales Usted camina. Si la persona entrevistada no puede contestar porque la cantidad de tiempo varía mucho día a día, pregunte: ¿Cuál es la cantidad total de tiempo que Usted pasó caminando en los últimos 7 días?"]

Horas por semana [WWHRS; Rango: 0-112]

Minutos por semana [WWMIN; Rango: 0-6720, 9998, 9999]

9998. No sabe /no está seguro(a)

9999. Rehusa contestar

LEA: Ahora piense acerca del tiempo que Usted pasó sentado(a) en la semana durante los últimos 7 días. Incluya el tiempo en el trabajo, en la casa, estudiando y durante el tiempo de descanso. Esto puede incluir tiempo que pasó sentado(a) en un escritorio, visitando amistades, leyendo, sentado(a) o acostado(a) viendo televisión.

7. Durante los últimos 7 días, ¿Cuánto tiempo en total usted usualmente pasó

sentado durante un día en la semana?

Horas por semana [SDHRS; 0-16]

Minutos por semana [SDMIN; Rango: 0-960, 998, 999]

998. No sabe /no está seguro(a) 999. Rehusa contestar

[Clarificación por parte del entrevistador: Incluya el tiempo que pasó acostado (despierto) así como sentado]

[Nota para el entrevistador: Se necesita un promedio de tiempo al día. Si la persona entrevistada no puede contestar porque la cantidad de tiempo varia día a día, pregunte: “Cuál fue la cantidad total de tiempo que Usted pasó sentado(a) el Miércoles pasado?”]

Horas el miércoles [SWHRS; Rango 0-16]

Minutos el miércoles [SWMIN; Rango: 0-960, 998, 999]

998. No sabe /no está seguro(a) 999. Rehusa contestar